(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-508317
(P2025-508317A)
(43)公表日　令和7年3月26日(2025.3.26)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K 16/46	*(2006.01)*	C07K	16/46		4B064
C07K 16/28	*(2006.01)*	C07K	16/28		4B065
C12N 15/13	*(2006.01)*	C12N	15/13		4C084
C12N 15/62	*(2006.01)*	C12N	15/62	Z	4C085
C12N 15/79	*(2006.01)*	C12N	15/79	Z	4C086

審査請求　有　予備審査請求　未請求　（全54頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-543273(P2024-543273)
(86)(22)出願日　令和5年1月17日(2023.1.17)
(85)翻訳文提出日　令和6年7月19日(2024.7.19)
(86)国際出願番号　PCT/CN2023/072510
(87)国際公開番号　WO2023/138551
(87)国際公開日　令和5年7月27日(2023.7.27)
(31)優先権主張番号　202210068506.0
(32)優先日　令和4年1月20日(2022.1.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　320000850
上海君▲実▼生物医▲薬▼科技股▲分▼有限公司
SHANGHAI JUNSHI BIOSCIENCES CO., LTD.
中華人民共和国２０１２１０上海市中国（上海）自由貿易▲試▼▲験▼区海趣路３６、５８号２号楼１３▲層▼
Floor 13, Building 2, Nos. 36 and 58, Haiqu Road, Pilot Free Trade Zone, Shanghai 201210 CHINA
(74)代理人　100120031
弁理士　宮嶋 学
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２０二重特異性抗体、並びにその使用

(57)【要約】
本発明は、ＣＤ３及びＣＤ２０を標的とする二重特異性抗体、並びにそれを含む組成物を提供する。本発明の二重特異性抗体をコードする核酸分子、本発明の二重特異性抗体を発現するためのベクター及び宿主細胞、並びに本発明の抗体又はその抗原結合フラグメントの治療及び診断方法と使用を更に提供する。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＣＤ２０及びＣＤ３に特異的に結合する二重特異性抗体であって、
（１）第１の重鎖可変領域（ＶＨ１）及び第１の軽鎖可変領域（ＶＬ１）を含む、ＣＤ２０結合ドメインを有する抗原結合フラグメントと、
（２）第２の重鎖可変領域（ＶＨ２）及び第２の軽鎖可変領域（ＶＬ２）を含む、ＣＤ３結合ドメインを有する抗原結合フラグメントと、を含む、
二重特異性抗体。
【請求項２】
以下のポリペプチド鎖を含む：
（１）ＣＤ２０結合ドメインを有する、式（Ｉ）及び式（ＩＩ）に示されるポリペプチド鎖：
ＶＨ１－ＣＨ１－Ｆｃ１　式（Ｉ）、
ＶＬ１－ＣＬ　式（ＩＩ）、及び
（２）ＣＤ２０及びＣＤ３結合ドメインを有する、式（ＩＩＩ）及び式（ＩＩ－２）に示されるポリペプチド鎖：
ＶＨ１－ＣＨ１－Ｌ－ＶＬ２－Ｌ－ＶＨ２－Ｌ－Ｆｃ２　式（ＩＩＩ）、
ＶＬ１－ＣＬ　式（ＩＩ－２）、又は
ＣＤ３結合ドメインを有する、式（ＩＶ）に示されるポリペプチド鎖：
ＶＬ２－Ｌ－ＶＨ２－Ｌ－Ｆｃ２　式（ＩＶ）、
そのうち、ＶＨは重鎖可変領域を表し、ＶＬは軽鎖可変領域を表し、ＦｃはＣＨ２及びＣＨ３を含み、ＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３は、それぞれ重鎖定常領域のドメイン１、２及び３を表し、ＶＬは軽鎖可変領域を表し、ＣＬは軽鎖定常領域を表し、Ｌは連結ペプチドを表し、各連結ペプチドは、相同又は相異であり、任意選択的に、ＣＨ１とＦｃ１との間にヒンジ領域が存在し、
式（Ｉ）、（ＩＩ）、（ＩＩ－２）、（ＩＩＩ）及び（ＩＶ）は、それぞれＮ末端からＣ末端まで順次連結され、
ＶＨ１及びＶＬ１により形成される抗原結合部位はＣＤ２０に結合し、且つＶＬ２及びＶＨ２により形成される抗原結合部位はＣＤ３に結合する、
請求項１に記載の二重特異性抗体。
【請求項３】
前記連結ペプチドは、アミノ酸配列（ＧＧＧＧＳ）ｎを含み、そのうち、ｎは、それぞれ１、２、３、４、５及び６から独立的に選択される、
請求項１又は２に記載の二重特異性抗体。
【請求項４】
前記ＶＨ１は、アミノ酸配列がそれぞれ配列番号１、配列番号２、及び配列番号３に示されるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２及びＨＣＤＲ３を含み、及び
前記ＶＬ１は、アミノ酸配列がそれぞれ配列番号４、配列番号５、及び配列番号６に示されるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３を含む、
請求項１～３の何れか一項に記載の二重特異性抗体。
【請求項５】
前記ＶＨ１は、配列番号７に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号７に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び
前記ＶＬ１は、配列番号８に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号８に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、
請求項４に記載の二重特異性抗体。
【請求項６】
前記ＶＨ２は、アミノ酸配列がそれぞれ配列番号９、配列番号１０及び配列番号１１に

示されるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２及びＨＣＤＲ３を含み、及び
前記ＶＬ２は、アミノ酸配列がそれぞれ配列番号１２、配列番号１３、及び配列番号１４に示されるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３を含む、
請求項１～３の何れか一項に記載の二重特異性抗体。
【請求項７】
前記ＶＨ２は、配列番号１５に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号１５に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び
前記ＶＬ２は、配列番号１６に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号１６に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、
請求項６に記載の二重特異性抗体。
【請求項８】
式（Ｉ）のポリペプチド鎖は、配列番号１７若しくは２３に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号１７若しくは２３に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び
式（ＩＩ）及び式（ＩＩ－２）のポリペプチド鎖は、配列番号１８に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号１８に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、
請求項１～３の何れか一項に記載の二重特異性抗体。
【請求項９】
式（ＩＩＩ）のポリペプチド鎖は、配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号１９に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、
請求項１～３の何れか一項に記載の二重特異性抗体。
【請求項１０】
式（ＩＶ）のポリペプチド鎖は、配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号２０に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、
請求項１～３の何れか一項に記載の二重特異性抗体。
【請求項１１】
式（Ｉ）、式（ＩＩ）に示されるポリペプチド鎖と、式（ＩＩＩ）、式（ＩＩ－２）に示されるポリペプチド鎖とを含み、そのうち、式（Ｉ）のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は配列番号２３に示され、式（ＩＩ）及び式（ＩＩ－２）のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は配列番号１８に示され、及び式（ＩＩＩ）のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は配列番号１９に示される、
請求項１～３の何れか一項に記載の二重特異性抗体。
【請求項１２】
式（Ｉ）、式（ＩＩ）に示されるポリペプチド鎖と、式（ＩＶ）に示されるポリペプチド鎖とを含み、そのうち、式（Ｉ）のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は配列番号１７に示され、式（ＩＩ）のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は配列番号１８に示され、及び式（ＩＶ）のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は配列番号２０に示される、
請求項１～３の何れか一項に記載の二重特異性抗体。
【請求項１３】
前記式（Ｉ）と式（ＩＩ）との間、及び式（ＩＩＩ）と式（ＩＩ－２）との間はジスルフィド結合によって連結され、且つ前記式（Ｉ）と式（ＩＩＩ）又は式（ＩＶ）との間は

、ジスルフィド結合及びＣＨ３ドメインのＫｎｏｂ　ｉｎｔｏ　Ｈｏｌｅ構造によって連結され、
　好ましくは、式（Ｉ）におけるＦｃ１はｋｎｏｂ－Ｆｃであり、式（ＩＩＩ）又は式（ＩＶ）におけるＦｃ２はｈｏｌｅ－Ｆｃであり、又は式（Ｉ）におけるＦｃ１はｈｏｌｅ－Ｆｃであり、式（ＩＩＩ）又は式（ＩＶ）におけるＦｃ２はｋｎｏｂ－Ｆｃである、
請求項１～１２の何れか一項に記載の二重特異性抗体。
【請求項１４】
　前記式（Ｉ）におけるＣＨ１－Ｆｃ１及び式（ＩＩＩ）又は式（ＩＶ）におけるＦｃ２は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのＩｇＧの形態であり、及び／又は式（ＩＩ）及び式（ＩＩ－２）におけるＣＬは、λ又はκ鎖由来である、
請求項１～１３の何れか一項に記載の二重特異性抗体。
【請求項１５】
　単離核酸であって、請求項１～１４の何れか一項に記載の二重特異性抗体におけるポリペプチド鎖の何れか１つ又は複数をコードする、
単離核酸。
【請求項１６】
　請求項１５に記載の核酸を含む発現ベクターであって、好ましくは、前記発現ベクターは真核生物発現ベクターである、
発現ベクター。
【請求項１７】
　請求項１５に記載の核酸又は請求項１６に記載の発現ベクターを含む宿主細胞であって、好ましくは、前記宿主細胞は真核細胞であり、より好ましくは、哺乳動物細胞である、
宿主細胞。
【請求項１８】
　請求項１～１４の何れか一項に記載の二重特異性抗体を調製する方法であって、前記方法は、請求項１５に記載の核酸の発現に適した条件下で請求項１６に記載の宿主細胞を培養し、前記宿主細胞から前記二重特異性抗体を回収することを含む、
方法。
【請求項１９】
　請求項１～１４の何れか一項に記載の二重特異性抗体、請求項１５に記載の核酸、請求項１６に記載の発現ベクター及び／又は請求項１７に記載の宿主細胞、並びに薬学的に許容される担体又は賦形剤を含む、
医薬組成物。
【請求項２０】
　癌を予防又は治療するための薬剤の調製における、請求項１～１４の何れか一項に記載の二重特異性抗体、請求項１５に記載の核酸、請求項１６に記載の発現ベクター、請求項１７に記載の宿主細胞及び／又は請求項１９に記載の医薬組成物の使用であって、前記癌、好ましくは急性Ｂリンパ球性白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、濾胞性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、慢性骨髄性白血病及びＢｕｒｋｉｔｔリンパ腫から選択される、
使用。
【請求項２１】
　受検者における癌を予防又は治療する方法であって、それを必要とする受検者に、請求項１～１４の何れか一項に記載の二重特異性抗体、請求項１５に記載の核酸、請求項１６に記載の発現ベクター、請求項１７に記載の宿主細胞、及び／又は請求項１９に記載の医薬組成物を投与することを含む、
方法。
【請求項２２】
　請求項１～１４の何れか一項に記載の二重特異性抗体を用いて試料中のＣＤ３及び／又はＣＤ２０の存在を検出する、

方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、抗体の分野に関し、具体的に、ＣＤ３及びＣＤ２０を標的とする二重特異性抗体、並びにそれを含む組成物に関する。本発明の抗体又はその抗原結合フラグメントをコードする核酸分子、本発明の抗体又はその抗原結合フラグメントを発現するためのベクター及び宿主細胞、並びに本発明の抗体又はその抗原結合フラグメントの治療及び診断方法と使用を更に関する。
【背景技術】
【０００２】
ＣＤ３（Ｔ細胞表面糖タンパク質ＣＤ３、サブユニットγ、δ、ε及びζを含むＴ細胞受容体のシグナル伝達共受容体）は、主にＴ細胞活性化シグナルの伝達を媒介する、全てのＴリンパ球の表面に発現される分化抗原である。体の免疫系の抗感染免疫において重要な役割を果たしている。ＣＤ３分子は、Ｔ細胞抗原受容体（Ｔ ｃｅｌｌ ｒｅｃｅｐｔｏｒ）と安定したＴＣＲ－ＣＤ３複合体を形成し、その細胞外領域は、主要組織適合性複合体クラスＩＩ分子を認識し、結合し、ＭＨＣ分子とのＴ細胞抗原受容体（Ｔ ｃｅｌｌ ｒｅｃｅｐｔｏｒ、ＴＣＲ）の結合の安定性を増強し、細胞内領域は、白血球ＣＤ３形質導入の活性化シグナルを増強することで、免疫系の活性化に関与し、調節する。ＣＤ３陽性リンパ球集団の数の指標は、体細胞の免疫状況を測定する重要な指標である。
【０００３】
ＣＤ２０は、Ｂリンパ球表面に特異的なマーカー分子であり、成熟Ｂ細胞及び大部分の悪性Ｂリンパ球において発現されるが、初期Ｂ細胞前駆細胞又は後期成熟形質細胞において発現されない。当該分子は、２９７個のアミノ酸残基から構成され、細胞膜を４回貫通し、その抗原エピトープは、第３、第４の膜貫通領域に糖鎖のない４３個のアミノ酸残基で構成される細胞外に露出した唯一のループである。ＣＤ２０の正確な機能は不明であり、ＣＤ２０は、Ｂ細胞の活性化及び分化に関与し、カルシウムチャネルとして機能する可能性がある。ＣＤ２０は、抗体と結合した後に細胞内に取り込まれず、細胞表面での明らかな脱落現象も起こらないため、Ｂリンパ球関連疾患を治療するための理想的な抗原であり、例えば、リツキシマブモノクローナル抗体及びオビヌツズマブモノクローナル抗体は、何れもＣＤ２０に対する抗体薬剤であり、且つ薬効が良好である。従来のＣＤ２０に対する抗体が腫瘍細胞に対する免疫細胞の殺傷効果を媒介することは依然として改善の余裕及び二重特異性抗体の利点を有することを考慮すると、良好な抗ＣＤ２０／ＣＤ３二重特異性抗体は、腫瘍細胞に対する免疫細胞の殺傷作用を良好に媒介することができ、臨床応用の見込みが非常に高い。
【０００４】
二重特異性抗体（ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｎｔｉｂｏｄｙ、ＢｓＡｂ）は、二重機能抗体とも呼ばれ、２つの異なる抗原又は２つの異なる抗原エピトープに同時に特異的に結合することができる。その特異性及び二重機能性により、腫瘍の免疫治療及び自己免疫疾患などの分野において良好な応用効果及び見込みを有する。二重特異性抗体は多種類の形態があり、また、異なる腫瘍関連抗原に対して、異なる二重特異性抗体の形態は、異なる効果を有し、その特異的機能のために、腫瘍の免疫治療において広い応用の見込みを有する。
【０００５】
抗ＣＤ３×ＣＤ２０二重特異性抗体について、現在、まだ医薬品が市販されておらず、本発明は、親和性、安全性及び安定性などの点で何れも高い効果を有する新規な二重特異性抗体を開発することを目的とする。
【発明の概要】
【０００６】
本明細書は、抗体工学方法によって構築される新規な二重特異性抗体分子を開示する。

【０００７】
本発明は、ＣＤ２０及びＣＤ３に特異的に結合する二重特異性抗体であって、
（１）第１の重鎖可変領域（ＶＨ１）及び第１の軽鎖可変領域（ＶＬ１）を含む、ＣＤ２０結合ドメインを有する抗原結合フラグメントと、
（２）第２の重鎖可変領域（ＶＨ２）及び第２の軽鎖可変領域（ＶＬ２）を含む、ＣＤ３結合ドメインを有する抗原結合フラグメントと、を含む二重特異性抗体を提供する。
【０００８】
幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体は、以下のポリペプチド鎖を含む：
（１）ＣＤ２０結合ドメインを有する、式（Ｉ）及び式（ＩＩ）に示されるポリペプチド鎖：
ＶＨ１－ＣＨ１－Ｆｃ１　式（Ｉ）、
ＶＬ１－ＣＬ　式（ＩＩ）、及び
（２）ＣＤ２０及びＣＤ３結合ドメインを有する、式（ＩＩＩ）及び式（ＩＩ－２）に示されるポリペプチド鎖：
ＶＨ１－ＣＨ１－Ｌ－ＶＬ２－Ｌ－ＶＨ２－Ｌ－Ｆｃ２　式（ＩＩＩ）、
ＶＬ１－ＣＬ　式（ＩＩ－２）、又は
ＣＤ３結合ドメインを有する、式（ＩＶ）に示されるポリペプチド鎖：
ＶＬ２－Ｌ－ＶＨ２－Ｌ－Ｆｃ２　式（ＩＶ）、
そのうち、ＶＨは重鎖可変領域を表し、ＶＬは軽鎖可変領域を表し、ＦｃはＣＨ２及びＣＨ３を含み、ＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３は、それぞれ重鎖定常領域のドメイン１、２及び３を表し、ＶＬは軽鎖可変領域を表し、ＣＬは軽鎖定常領域を表し、Ｌは連結ペプチドを表し、各連結ペプチドは、相同又は相異であり、任意選択的に、ＣＨ１とＦｃ１との間にヒンジ領域が存在し、
式（Ｉ）、（ＩＩ）、（ＩＩ－２）、（ＩＩＩ）及び（ＩＶ）は、それぞれＮ末端からＣ末端まで順次連結され、
ＶＨ１及びＶＬ１により形成される抗原結合部位はＣＤ２０に結合し、且つＶＬ２及びＶＨ２により形成される抗原結合部位はＣＤ３に結合する。
【０００９】
幾つかの実施形態において、本発明に記載の連結ペプチドは、アミノ酸配列（ＧＧＧＧＳ）ｎを含み、そのうち、ｎは、それぞれ１、２、３、４、５又は６から独立的に選択される。
【００１０】
幾つかの実施形態において、本発明に記載のＶＨ１は、アミノ酸配列がそれぞれ配列番号１、配列番号２及び配列番号３に示されるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２及びＨＣＤＲ３を含み、及び上記ＶＬ１は、アミノ酸配列がそれぞれ配列番号４、配列番号５及び配列番号６に示されるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３を含む。
【００１１】
幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体において、
上記ＶＨ１は、配列番号７に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号７に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び
上記ＶＬ１は、配列番号８に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号８に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【００１２】
幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体において、上記ＶＨ２は、アミノ酸配列がそれぞれ配列番号９、配列番号１０及び配列番号１１に示されるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２及びＨＣＤＲ３を含み、及び上記ＶＬ２は、アミノ酸配列がそれぞれ配列番号１２、配列番号１３及び配列番号１４に示されるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣ

ＤＲ３を含む。
【００１３】
幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体において、
上記ＶＨ２は、配列番号１５に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号１５に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び
上記ＶＬ２は、配列番号１６に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号１６に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【００１４】
幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体において、
式（Ｉ）のポリペプチド鎖は、配列番号１７若しくは２３に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号１７若しくは２３に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び
式（ＩＩ）及び（ＩＩ－２）のポリペプチド鎖は、配列番号１８に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号１８に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【００１５】
幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体において、式（ＩＩＩ）のポリペプチド鎖は、配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号１９に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【００１６】
幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体において、式（ＩＶ）のポリペプチド鎖は、配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号２０に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【００１７】
幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体は、式（Ｉ）、式（ＩＩ）に示されるポリペプチド鎖と、式（ＩＩＩ）、式（ＩＩ－２）に示されるポリペプチド鎖とを含み、式（Ｉ）のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は配列番号２３に示され、式（ＩＩ）及び式（ＩＩ－２）のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は配列番号１８に示され、及び式（ＩＩＩ）のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は配列番号１９に示される。
【００１８】
幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体は、式（Ｉ）、式（ＩＩ）に示されるポリペプチド鎖と、式（ＩＶ）に示されるポリペプチド鎖とを含み、そのうち、式（Ｉ）のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は配列番号１７に示され、式（ＩＩ）のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は配列番号１８に示され、及び式（ＩＶ）のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は配列番号２０に示される。
【００１９】
幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体において、式（Ｉ）と式（ＩＩ）の間、式（ＩＩＩ）と式（ＩＩ－２）の間は、ジスルフィド結合によって連結され、及び上記式（Ｉ）と式（ＩＩＩ）又は式（ＩＶ）の間は、ジスルフィド結合及びＣＨ３ドメインのＫｎｏｂ　ｉｎｔｏ　Ｈｏｌｅ構造によって連結され、
好ましくは、式（Ｉ）におけるＦｃ１はｋｎｏｂ－Ｆｃであり、式（ＩＩＩ）又は式（ＩＶ）におけるＦｃ２はｈｏｌｅ－Ｆｃであり、又は式（Ｉ）におけるＦｃ１はｈｏｌｅ－Ｆｃであり、式（ＩＩＩ）又は式（ＩＶ）におけるＦｃ２はｋｎｏｂ－Ｆｃである。
【００２０】

幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体において、上記式（Ｉ）におけるＣＨ１－Ｆｃ１及び式（ＩＩＩ）におけるＦｃ２は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３若しくはＩｇＧ４などのＩｇＧの形態であり、及び／又は式（ＩＩ）及び式（ＩＩ－２）におけるＣＬは、λ若しくはκ鎖由来である。

【００２１】

更に別の様態において、本発明は、本明細書に記載の二重特異性抗体におけるポリペプチド鎖の何れか１つ又は複数をコードする単離核酸を提供する。

【００２２】

更に別の様態において、本発明は、本明細書に記載の核酸を含む発現ベクターであって、好ましくは、上記発現ベクターは、真核生物発現ベクターである、発現ベクターを提供する。

【００２３】

更に別の様態において、本発明は、本明細書に記載の核酸又は本発明に記載の発現ベクターを含む宿主細胞であって、上記宿主細胞は、好ましくは真核細胞であり、より好ましくは哺乳動物細胞である、宿主細胞を提供する。

【００２４】

更に別の様態において、本発明は、本明細書に記載の核酸の発現に適した条件下で本明細書に記載の宿主細胞を培養し、上記宿主細胞から上記二重特異性抗体を回収することを含む、本明細書に記載の二重特異性抗体を調製する、方法を提供する。

【００２５】

更に別の様態において、本発明は、本明細書に記載の二重特異性抗体、本明細書に記載のポリヌクレオチド、本明細書に記載の発現ベクター及び／又は本明細書に記載の宿主細胞、及び薬学的に許容される担体又は賦形剤を含む、医薬組成物を提供する。

【００２６】

更に別の様態において、本発明は、癌を予防又は治療するための薬剤の調製における、本明細書に記載の二重特異性抗体、本明細書に記載のポリヌクレオチド、本明細書に記載の発現ベクター、本明細書に記載の宿主細胞及び／又は本明細書に記載の医薬組成物の使用であって、上記癌は、好ましくは急性Ｂリンパ球性白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、濾胞性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、慢性骨髄性白血病、又はＢｕｒｋｉｔｔリンパ腫から選択される、使用を提供する。

【００２７】

更に別の様態において、本発明は、受検者における癌を予防又は治療する方法であって、それを必要とする受検者に、本明細書に記載の二重特異性抗体、本明細書に記載のポリヌクレオチド、本明細書に記載の発現ベクター、本明細書に記載の宿主細胞及び／又は本明細書に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法を提供する。

【００２８】

更に別の様態において、本発明は、癌を治療するための、本明細書に記載の二重特異性抗体、本明細書に記載のポリヌクレオチド、本明細書に記載の発現ベクター、本明細書に記載の宿主細胞及び／又は本明細書に記載の医薬組成物を提供する。

【００２９】

幾つかの実施形態において、本発明に記載の癌は、急性Ｂリンパ球性白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、濾胞性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、慢性骨髄性白血病、又はＢｕｒｋｉｔｔリンパ腫から選択される。

【００３０】

更に別の様態において、本発明は、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント、本明細書に記載のポリヌクレオチド、本明細書に記載の発現ベクター、本明細書に記載の宿主細胞及び／又は本明細書に記載の医薬組成物、及び１つ又は複数の別の治療剤を含む薬剤の組み合わせを提供する。

【００３１】

更に別の様態において、本発明は、本明細書に記載の二重特異性抗体を用いて試料中の

ＣＤ３及び／又はＣＤ２０の存在を検出する方法を提供する。
【００３２】
更に別の様態において、本発明は、本明細書に記載の抗体又は本明細書に記載の医薬組成物を含む試薬キットを提供する。
【図面の簡単な説明】
【００３３】
【図１】抗ＣＤ３×ＣＤ２０二重特異性抗体の分子構造の模式図である。１ａ：ＴＺＴ６構造の模式図、１ｂ：ＴＺＴ７構造の模式図。
【図２】ＥＬＩＳＡによる二重特異性抗体とヒトＣＤ３εとの結合への検出を示す図である。
【図３】二重特異性抗体とＲａｊｉ細胞との結合を示す図である。
【図４】二重特異性抗体とＪｕｒｋａｔ細胞との結合を示す図である。
【図５】二重特異性抗体と過剰発現カニクイザルＣＤ３ｅ細胞との結合を示す図である。
【図６】ルシフェラーゼレポーター遺伝子系における二重特異性抗体の活性を示す図である。
【図７】Ｔリンパ球に対する二重特異性抗体の活性化活性を示す図である。
【図８】二重特異性抗体がＴ細胞によるＢリンパ腫細胞への殺傷活性を促進することを示す図である。
【図９】Ｂ１６　ＯＶＡ　ｈｕＣＤ２０腫瘍成長に対する二重特異性抗体ＴＺＴ６及びＴＺＴ７の阻害を示す図である。
【図１０】Ｂ１６　ＯＶＡ　ｈｕＣＤ２０腫瘍成長に対する二重特異性抗体ＴＺＴ７の阻害を示す図である。
【図１１】ヒトリンパ腫Ｒａｊｉ　Ｍｉｘｅｎｏモデルに対する二重特異性抗体の阻害作用を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００３４】
定義
特に断りのない限り、本発明の実施にあたって、分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生物化学、免疫学などの通常技術を採用するが、これらは本分野の技術範囲内である。
【００３５】
本発明をより容易に理解するために、幾つかの技術用語を具体的に以下のように定義する。本明細書のその他の部分で明確に定義しない限り、本明細書で使用される技術用語は、本発明の当業者が通常理解する意味を有する。本分野の定義及び用語について、専門者は、具体的にＣｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ａｕｓｕｂｅｌ）を参照することができる。アミノ酸残基の略称は、本分野で使用される、２０個の常用Ｌ－アミノ酸の１つを表す、標準３文字及び／又は１文字のコードである。本明細書で特に明確な説明のない限り、本明細書（特許請求の範囲を含む）で使用される単数形態は、それに対応する複数形態を含む。
【００３６】
「約」という用語は、数字数値と組み合わせて使用される場合、指定された数値よりも５％小さい下限及び指定された数値よりも５％大きい上限を有する範囲内の数字数値を包含することを意味する。
【００３７】
「及び／又は」という用語は、オプションの何れか１つ、或いはオプションの何れか２つ又はそれ以上の組み合わせを意味すると理解すべきである。
【００３８】
「ＣＤ３」という用語は、Ｔ細胞受容体複合物の一部として、３つの異なる鎖ＣＤ３ε、ＣＤ３δ及びＣＤ３γからなることを指す。ＣＤ３は、例えば、Ｔ細胞に対する抗ＣＤ３抗体の固定作用によってＴ細胞上に集中し、Ｔ細胞受容体媒介性活性化に類似するが、

ＴＣＲクローンの特異性に依存しないＴ細胞の活性化をもたらす。抗ＣＤ３抗体の大部分は、ＣＤ３ε鎖を認識する。当該用語は、特に断らない限り、任意の脊椎動物（霊長類動物（例えば、ヒト））などの哺乳動物及びげっ歯類動物（例えば、マウス及びラット）に由来する任意の天然ＣＤ３を指す。当該用語は、「全長」の未処理ＣＤ３、及び細胞内処理によって産生される任意形態のＣＤ３又はその任意のフラグメントを含む。当該用語は、天然に存在するＣＤ３の変異体、例えば、スプライス変異体又は対立遺伝子変異体を更に含む。好ましい一実施形態において、ＣＤ３は、ヒト又はカニクイザルに由来するＣＤ３の全長又はそのフラグメント（例えば、シグナルペプチドを欠くその成熟フラグメント）を指す。好ましい一実施形態において、ＣＤ３は、マウス／ラットに由来する全長又はそのフラグメント（例えば、シグナルペプチドを欠くその成熟フラグメント）を指す。

【００３９】

「ヒトＣＤ２０」又は「ＣＤ２０」という用語は、ヒトＣＤ２０（ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ　Ｎｏ．Ｐ１１８３６）を指し、及び

細胞（腫瘍細胞を含む）によって天然に発現されるか、又はＣＤ２０遺伝子若しくはｃＤＮＡでトランスフェクトされた細胞上で発現される、ＣＤ２０の任意の変異体、アイソフォーム、及び種ホモログを含む。種ホモログは、アカゲザルＣＤ２０（ｍａｃａｃａ　ｍｕｌａｔｔａ；ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ　Ｎｏ　Ｈ９ＹＸＰ１）及びカニクイザルＣＤ２０を含む。

【００４０】

「アミノ酸配列同一性のパーセンテージ（％）」又は略称「同一性」という用語は、配列同一性の最大パーセンテージを得るためにアミノ酸配列をアラインメントし（必要に応じてギャップを導入する）、任意の保存的置換を配列同一性の部分としない場合、候補アミノ酸配列におけるアミノ酸残基と参照アミノ酸配列における同じアミノ酸残基とのパーセンテージと定義される。アミノ酸配列同一性のパーセンテージを測定するには、例えば、ＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ又はＭＥＧＡＬＩＧＮ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアなど、公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを用いて、本分野の各種の方法を用いて配列をアラインメントすることができる。当業者は、比較される配列の全長に対して最大アラインメントを得るために必要な任意のアルゴリズムを含む、測定及びアラインメントの適切なパラメータを決定することができる。

【００４１】

「免疫応答」という用語は、例えば、リンパ球、抗原提示細胞、貪食細胞、顆粒球及び上記細胞又は肝臓から産生される可溶性高分子（抗体、サイトカイン及び補体を含む）の作用を指し、当該作用により、侵入した病原体、病原体を感染した細胞又は組織、癌細胞又は自体免疫又は病理学的炎症の場合の正常なヒト細胞又は組織が人体から選択的に損害、破壊又は除去されることをもたらす。

【００４２】

「シグナル伝達経路」又は「シグナル伝達活性」という用語は、細胞の一部から細胞の別の部分へのシグナル伝達をもたらす、成長因子の受容体への結合などのタンパク質間相互作用によって通常開始される生化学的因果関係を指す。一般的に、伝達は、シグナル伝達を引き起こす一連反応における１つ又は複数のタンパク質上の１つ又は複数のチロシン、セリン又はトレオニン残基の特定リン酸化を含む。最後から二番目の過程は通常、細胞核イベントを含むことにより、遺伝子発現の変化をもたらす。

【００４３】

「活性」又は「生理活性」という用語、或いは「生物学的特性」又は「生物学的特徴」という用語は、本明細書で相互に交換使用可能であり、エピトープ／抗原親和性及び特異性、インビボ又はインビトロにおいてＣＤ２０活性を中和又は拮抗する能力、ＩＣ５０、抗体のインビボ安定性及び抗体の免疫原性質を含むが、これらに限定されない。本分野で周知の抗体の他の同定可能な生物学的特性又は特徴は、例えば、交差反応性（即ち、通常、標的ペプチドの非ヒトホモログ、又は他のタンパク質若しくは組織との交差反応性）、及び哺乳動物細胞におけるタンパク質の高発現レベルを維持する能力を含む。本分野で周

知の技術を利用して前述した特性又は特徴を観察、測定又は評価し、上記技術は、ＥＬＩＳＡ、ＦＡＣＳ又はＢＩＡＣＯＲＥプラズマ共鳴分析、制限を受けないインビボ又はインビトロにおける中和測定、受容体結合、サイトカイン又は成長因子の産生及び／又は分泌、シグナル伝達、及び異なる由来（ヒト、霊長類又は任意の他の由来）の組織フラグメントの免疫組織化学を含むが、これらに限定されない。

【００４４】

「抗体」という用語は、所望の生理活性を有する任意の形態の抗体を指す。従って、最も広義に使用される場合、それは具体的には、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、キメラ抗体及びキャメル化単一ドメイン抗体を含むが、これらに限定されない。

【００４５】

「単離した抗体」という用語は、結合化合物の精製状態を指し、且つこのような場合、当該分子が実質的に核酸、タンパク質、脂質、糖、細胞破片及び成長培地などの他の物質などのその他の生物分子を含まないことを意味する。「単離（した）」という用語は、本明細書に記載の結合化合物の実験的又は治療的適用を明らかに妨げる量で存在しない限り、このような物質が完全に存在しない、或いは水、緩衝液又は塩が存在しないことを意味するのではない。

【００４６】

「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体群から得られる抗体を指し、即ち、天然に存在し得る少量の変異以外、この群からなる各抗体は同じである。モノクローナル抗体は高い特異性を有し、単一の抗原エピトープに対するものである。それに対して、通常の（ポリクローナル）抗体調製物は通常、異なるエピトープに対する大量の（又は異なるエピトープに対して特異性を有する）抗体を含む。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均質な抗体群から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法によって抗体を産生する必要があると解釈されない。

【００４７】

「二重特異性抗体」という用語は、２つの独立した抗原に結合することができるか、又は同一抗原内の異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体分子を指す。例えば、幾つかの実施形態において、二重特異性抗体分子の一方のアームは腫瘍関連抗原に結合し、他方のアームは免疫細胞関連抗原（例えば、ＣＤ３分子）に結合し、このように腫瘍細胞において細胞性免疫関連メカニズムを活性化し、開始することができる。

【００４８】

「全長抗体」という用語は、天然に存在する場合、４本のペプチド鎖を含む免疫グロブリン分子を指し、２本の重（Ｈ）鎖（全長の場合は約５０～７０ｋＤａ）及び２本の軽（Ｌ）鎖（全長の場合は約２５ｋＤａ）は、ジスルフィド結合によって互いに連結される。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書においてＶＨと略される）と重鎖定常領域（本明細書においてＣＨと略される）からなる。重鎖定常領域は、ＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３の３つのドメインからなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書においてＶＬと略される）と軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、１つのドメインＣＬからなる。ＶＨ領域及びＶＬ領域は、高可変性を有する相補性決定領域（ＣＤＲ）と、その間にフレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれるより保存される領域と、更に細かく区分することができる。各ＶＨ領域又はＶＬ領域は、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４の順でアミノ基端末からカルボキシル基端末まで配列された３つのＣＤＲ及び４つのＦＲからなる。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫グロブリンが宿主組織又は因子（免疫系の各細胞（例えば、エフェクター細胞）及び代表的な補体系の第一成分（Ｃ１ｑ）を含む）に対する結合を媒介することができる。

【００４９】

抗体（「親抗体」）の「抗原結合フラグメント」という用語は、親抗体の抗原結合領域

又は可変領域（例えば、１つ又は複数のＣＤＲ）の少なくとも１つのフラグメントを通常含み、親抗体の少なくとも一部の結合特異性を保持する、抗体のフラグメント又は誘導体を含む。抗体結合フラグメントの実例は、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、及びＦｖフラグメント、二重抗体、線形抗体、ｓｃ‐Ｆｖなどの単鎖抗体分子、抗体フラグメントから形成されるナノボディ（ｎａｎｏｂｏｄｙ）、及び多重特異性抗体を含むが、これらに限定されない。抗原結合活性がモル濃度に示される場合、結合フラグメント又は誘導体は通常、その抗原結合活性の少なくとも１０％を保持する。結合フラグメント又は誘導体が親抗体の抗原結合親和力の少なくとも２０％、５０％、７０％、８０％、９０％、９５％、又は１００％又はより高い親和性を保持することは好ましい。抗体の抗原結合フラグメントは、その生理活性を明らかに変えない保存又は非保存アミノ酸置換（抗体の「保存的変異体」又は「機能保存的変異体」をいう）を含むことが期待される。「結合化合物」という用語は、抗体及びその結合フラグメントの両者を指す。

【００５０】

「単鎖Ｆｖ」又は「ｓｃＦｖ」抗体という用語は、抗体のＶＨドメイン及びＶＬドメインを含む抗体フラグメントを指し、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。Ｆｖポリペプチドは一般に、ｓｃＦｖが抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にする、ＶＨとＶＬドメインの間のポリペプチドリンカーを更に含む。

【００５１】

「Ｆｃ」又は「Ｆｃ領域」又は「Ｆｃフラグメント」という用語は、ＩｇＡ、ＩｇＤ及びＩｇＧのＣＨ２及びＣＨ３ドメインからなるか、又はヒンジ領域を介してＩｇＥ及びＩｇＭのＣＨ２、ＣＨ３及びＣＨ４ドメインからなるポリペプチドを指す。Ｆｃフラグメントの分解は可変であるが、ヒトＩｇＧの重鎖Ｆｃフラグメントは通常、Ａ２３１からそのカルボキシ基末端までのこのポリペプチドを指す。

【００５２】

「ヒンジ領域」という用語は、ＣＨ１とＣＨ２との間に位置し、プロリンに富み、容易に伸長して屈曲する抗体中のポリペプチド鎖を指す。一方、公認されているＩｇＧヒンジ領域は、第２１６位から２３０位までのアミノ酸残基からなるポリペプチド鎖である。

【００５３】

「ドメイン抗体」という用語は、重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のみを含有する免疫機能性免疫グロブリンフラグメントである。場合によれば、２つ又はそれ以上のＶＨ領域は、ペプチドリンカーと共有結合して二価ドメイン抗体を形成する。二価ドメイン抗体の２個のＶＨ領域は、同じ又は異なる抗原を標的とすることができる。

【００５４】

「エピトープ」という用語は、抗体に特異的に結合できるタンパク質決定基を指す。エピトープは通常、アミノ酸又は糖側鎖などの表面クラスター化分子からなり、一般的には、特定の３次元構造特徴、並びに特定の電荷特徴を有する。立体構造エピトープ及び非立体構造エピトープは、後者ではなく前者への結合が変性溶媒の存在下で失われるという点で異なる。エピトープは、結合に直接関与するアミノ酸残基、及び特異的抗原結合ペプチドによって効果的にブロック又はカバーされているアミノ酸残基（換言すれば、アミノ酸残基は、特異的抗原結合ペプチドのフットプリント内にある）などの、結合に直接関与しない他のアミノ酸残基を含み得る。

【００５５】

「二価抗体」という用語は、２個の抗原結合部位を含む。場合によれば、２個の結合部位は同じ抗原特異性を有する。しかし、二価抗体は二重特異性であってもよい。

【００５６】

「二重抗体」という用語は、２個の抗原結合部位を有する小さな抗体フラグメントを指し、上記フラグメントは、同一ポリペプチド鎖（ＶＨ－ＶＬ又はＶＬ－ＶＨ）において軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）に連結された重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含む。同一鎖にある２個のドメイン間のペアリングが不可能になるほど短いリンカーを使用することにより、当該ドメインは、別の鎖の相補ドメインがペアリングされて、２個の抗原結合部位を産生す

る。
【００５７】
「キメラ抗体」という用語は、第１の抗体の可変ドメインと第２の抗体の定常ドメインとを有する抗体を指し、第１の抗体及び第２の抗体は異なる種に由来する。通常、可変ドメインはげっ歯動物などの抗体（「親抗体」）から得られ、定常ドメイン配列はヒト抗体から得られ、それにより、親げっ歯動物抗体に比べて、得られたキメラ抗体は、ヒト受検者において不良免疫応答を誘導する可能性が比較的低い。
【００５８】
「ヒト化抗体」という用語は、ヒトと非ヒト（例えば、マウス、ラット）抗体に由来する配列を含有する抗体の形態である。一般には、ヒト化抗体は、実質的に全ての少なくとも１個、通常、２個の可変ドメインを含み、そのうち、全て又は実質的に全ての超可変ループは、非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに相当し、全て又は実質的に全てのフレームワーク（ＦＲ）領域は、ヒト免疫グロブリン配列のフレームワーク領域である。ヒト化抗体は、任意に少なくとも一部のヒト免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）を含む。
【００５９】
「完全ヒト抗体」という用語は、ヒト免疫グロブリンタンパク質配列のみを含む抗体を指す。例えば、マウス、マウス細胞又はマウス細胞由来のハイブリドーマに産生される場合、完全ヒト抗体にマウス糖鎖を含んでもよい。同様に、「マウス抗体」は、マウス免疫グロブリン配列のみを含む抗体を指す。或いは、ラット、ラット細胞又はラット細胞由来のハイブリドーマに産生される場合、完全ヒト抗体がラット糖鎖を含んでもよい。同様に、「ラット抗体」は、ラット免疫グロブリン配列のみを含む抗体を指す。
【００６０】
「アイソタイプ」抗体は、重鎖定常領域遺伝子により提供される抗体クラス（例えば、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２又はＩｇＧ４などのＩｇＧ）を指す。アイソタイプは、これらのクラスのうちの１つの修飾形態を更に含み、そのうち、修飾は、例えば、エフェクター機能又はＦｃ受容体に対する結合を増強又は低減させるために、Ｆｃ機能を改変するようになされる。
【００６１】
「エピトープ」という用語は、抗体が結合する抗原領域を指す。エピトープは、連続したアミノ酸又はタンパク質の３次折り畳みにより並置される連続していないアミノ酸から形成され得る。
【００６２】
「親和性」又は「結合親和性」は、結合対のメンバー同士の相互作用を反映する固有結合親和性を指す。そのリガンドＹに対する分子Ｘの親和性は、通常、平衡解離定数（ＫＤ）で表し、平衡解離定数は、解離速度定数と結合速度定数（それぞれｋｄｉｓ及びｋｏｎ）との比である。親和性は、本分野における既知の一般的な方法により測定することができる。親和性を測定するための１つの具体的な方法は、本明細書におけるＦｏｒｔｅＢｉｏ動力学結合測定法である。
【００６３】
タンパク質又は細胞に「結合しない」という用語は、タンパク質又は細胞に結合しないこと、又はこれらに高親和性で結合しないことを指し、即ち、タンパク質又は細胞に結合するＫＤは１．０×１０$^{-6}$Ｍ又はそれ以上であり、より好ましくは１．０×１０$^{-5}$Ｍ又はそれ以上であり、より好ましくは１．０×１０$^{-4}$Ｍ又はそれ以上であり、１．０×１０$^{-3}$Ｍ又はそれ以上であり、より好ましくは１．０×１０$^{-2}$Ｍ又はそれ以上である。
【００６４】
「高親和性」という用語は、ＩｇＧ抗体に関して、抗原に対するＫＤが１．０×１０$^{-6}$Ｍ又はそれ以下であり、好ましくは５．０×１０$^{-8}$Ｍ又はそれ以下であり、より好ましくは１．０×１０$^{-8}$Ｍ又はそれ以下であり、５．０×１０$^{-9}$Ｍ又はそれ以下であり、更に好ましくは１．０×１０$^{-9}$Ｍ又はそれ以下であることを指す。他の抗体アイソフ

ォームに対して、「高親和性」結合は変化する可能性がある。例えば、ＩｇＭアイソフォームの「高親和性」結合は、ＫＤが１０－６Ｍ又はそれ以下であり、好ましくは１０－７Ｍ又はそれ以下であり、より好ましくは１０－８Ｍ又はそれ以下であることを指す。

【００６５】

「抗体依存性細胞傷害性」、「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性」又は「ＡＤＣＣ」という用語は、免疫系エフェクター細胞により細胞膜表面抗原がＣｌａｕｄｉｎ１８．２抗体などの抗体と結合された癌細胞などの標的細胞を能動的に溶解する細胞媒介性免疫防御を指す。

【００６６】

「補体依存性細胞傷害性」又は「ＣＤＣ」という用語は、ＩｇＧ及びＩｇＭ抗体のエフェクター機能であり、表面抗原に結合する場合、膜攻撃複合体の形成及び標的細胞の分解を含む典型的な補体経路が誘発される。本発明の抗体は、ＣＤ２０に結合する場合、癌細胞に対するＣＤＣを誘発する。

【００６７】

「核酸」又は「ポリヌクレオチド」という用語は、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）又はリボ核酸（ＲＮＡ）及びその一本鎖又は二本鎖形態のポリマーである。明確な制限がない限り、用語は、参照核酸と類似する結合性質を有し、天然に存在するヌクレオチドと類似する形態で代謝される、既知の天然ヌクレオチドの類似体を含有する核酸を含む（Ｋａｒｉｋｏらに所有するアメリカ特許Ｎｏ．８，２７８，０３６を参照し、それは、ウリジンがシュードウリジンで代用されるｍＲＮＡ分子、上記ｍＲＮＡ分子の合成方法、及びインビボで治療性タンパク質の送達に利用される方法を開示した）。特に断りのない限り、特定の核酸配列は、その保存・修飾された変異体（例えば、縮重コドンの置換）、対立遺伝子、オーソログ、ＳＮＰ、相補配列、及び明確に示された配列も暗黙的に含む。具体的には、縮重コドンの置換は、そのうちの１つ又は複数の選択された（又は全部）コドンの第３位が混合塩基及び／又はデオキシイノシン残基で置換された配列の生成により実現され得る（Ｂａｔｚｅｒら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．１９：５０８１（１９９１）；Ｏｈｔｓｕｋａら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６０：２６０５－２６０８（１９８５）；Ｒｏｓｓｏｌｉｎｉら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｐｒｏｂｅｓ ８：９１－９８（１９９４））。

【００６８】

「構築体」は、任意の供給源に由来し、ゲノムの組み込み又は自律複製を可能にし、１つ又は複数のポリヌクレオチド分子が機能的に連結された（即ち、操作可能に連結された）下記ポリヌクレオチド分子を構成する任意の組換えポリヌクレオチド分子（プラスミド、コスミド、ウイルス、自律複製ポリヌクレオチド分子、ファージ、若しくは線状若しくは環状の一本鎖若しくは二本鎖のＤＮＡ若しくはＲＮＡポリヌクレオチド分子など）を指す。組換え構築体は、通常、宿主細胞におけるポリヌクレオチドの転写を誘導する転写開始調節配列に操作可能に連結された本発明のポリヌクレオチドを含む。本発明の核酸の発現は、異種及び非異種（即ち、内因性）プロモーターの両者を使用して誘導することができる。

【００６９】

「ベクター」は、形質転換の目的で使用され得る任意の組換えポリヌクレオチド構築体を指す（即ち、異種ＤＮＡを宿主細胞に導入する）。ベクターの１種類は「プラスミド」であり、追加のＤＮＡセグメントを当該環に連結することができる環状二本鎖ＤＮＡ環を指す。ベクターのもう１種類は、追加のＤＮＡセグメントをウイルスゲノムに連結することができるウイルスベクターである。幾つかのベクターは、導入された宿主細胞での自律複製が可能である（例えば、細菌複製開始点を有する細菌ベクター及びエピソーム型哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム性哺乳動物ベクター）は、宿主細胞に導入されると、宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより宿主ゲノムと共に複製される。また、幾つかのベクターは、操作的に連結される遺伝子の発現を誘導することができる。本明細書ではこのようなベクターを「発現ベクター」と呼ぶ。

【００７０】
本明細書で使用される「発現ベクター」という用語は、宿主細胞に形質転換、トランスフェクション又は形質導入される際に、標的遺伝子を複製及び発現できる核酸分子を指す。発現ベクターは、ベクターの維持を確実にし、及び必要に応じて宿主内で増幅を提供するために、１つ又は複数の表現型選択マーカー及び複製開始点を含む。
【００７１】
文脈から別に明確に規定しない限り、細胞又は受容体に使用される「活性化」、「刺激」及び「処理」は、細胞又は受容体に使用されるリガンド活性化、刺激又は処理などの同じ意味を有することができる。「リガンド」は、サイトカイン、サイトカイン変異体、アナログ、変異タンパク質、及び抗体由来の結合化合物などの天然リガンドと合成リガンドを含む。「リガンド」は、サイトカインのペプチド模倣物や抗体のペプチド模倣物などの小分子も含む。「活性化」は、内部メカニズム及び外部や環境の要因により調節された細胞の活性化を指す。「応答／反応」、例えば細胞、組織、器官又は生体の応答は、生化学又は生理学的行動（例えば、生物学的区画内の濃度、密度、接着又は移動、遺伝子発現速度又は分化状態）の変化を含み、そのうち、変化は、活性化、刺激又は処理に関連するか、又は遺伝子プログラミングなどの内部メカニズムに関連する。
【００７２】
本明細書で使用されるように、一実施形態において、任意の疾患又は病症の「治療」又は「療治」という用語は、疾患又は病症の改善（即ち、疾患の進行又はその臨床症状の少なくとも１つの軽減、阻止又は減少）を意味する。別の一実施形態において、「治療」又は「療治」とは、患者が認識できないそれらの物理パラメータを含む少なくとも１つの身体パラメータの軽減又は改善を指す。別の一実施形態において、「治療」又は「療治」とは、身体（例えば、認識できる症状の安定）、生理（例えば、身体パラメータの安定）、又はその両方において疾患又は病症を調節することを指す。本明細書で明確に説明しない限り、疾患の治療及び／又は予防を評価するための方法は本分野において通常既知である。
【００７３】
「受検者」は、任意のヒト又は非ヒト動物を含む。「非ヒト動物」という用語は、非ヒト霊長類動物、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類動物、爬虫類動物などの哺乳動物及び非哺乳動物など、全ての脊椎動物を含む。本明細書で使用されるように、「ｃｙｎｏ」又は「カニクイザル」という用語は、カニクイザルを指す。
【００７４】
１つ又は複数の他の治療剤との「併用」投与は、同時（共同）投与及び任意順序の連続投与を含む。
【００７５】
「治療有効量」「治療有効用量」及び「有効量」は、本発明のＣＤ２０抗体又はその抗原結合フラグメントを単独で又は他の治療薬剤との組み合わせで細胞、組織又は受検者に投与する場合、１つ又は複数の疾患又は病状の症状或いは当該疾患又は病状の進行を有効的に予防又は改善する量を指す。治療有効用量はまた、関連医学病症を治療、治癒、予防又は改善する量、或いはこれらの病症の治療、治癒、予防又は改善の速度を増加させる量など、症状の改善をもたらすのに十分な抗体又はその抗原結合フラグメントの量を指す。単独で投与される活性成分が個体に投与される場合、治療有効用量は、この成分のみを指す。組み合わせて投与される場合、治療有効用量は、組み合わせ投与、逐次投与又は同時投与にも関わらず、治療効果を誘発する活性成分の合計量を指す。治療剤の有効量は、診断標準又はパラメータを少なくとも１０％、一般的に少なくとも２０％、好ましくは少なくとも約３０％、より好ましくは少なくとも４０％、最も好ましくは少なくとも５０％向上させる。
【００７６】
「癌」及び「癌性」とは、通常では細胞の成長が調節できないことを特徴とする、哺乳動物における生理的疾患を指し、或いはそのような生理的疾患を説明する。この定義は、

良性腫瘍、悪性腫瘍及び休眠腫瘍又は腫瘍の微小転移を含む。癌の例は、癌、リンパ腫、芽腫、肉腫及び白血病を含むが、これらに限定されない。このような癌のより具体的な例は、扁平上皮癌、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌及び肺扁平上皮癌を含む）、腹膜癌、肝細胞癌、胃の癌又は胃癌（胃腸癌を含む）、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌（ｈｅｐａｔｏｍａ）、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌又は腎臓の癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓の癌、及び各種の頭頸部癌、Ｂ細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、小リンパ球性（ＳＬ）ＮＨＬ、中悪性度／濾胞性ＮＨＬ、中悪性度びまん性ＮＨＬ、高悪性度免疫芽球性ＮＨＬ、高悪性度リンパ芽球性ＮＨＬ、高悪性度小非分割細胞性ＮＨＬ、バルキー病変（ｂｕｌｋｙ　ｄｉｓｅａｓｅ）ＮＨＬ、マントル細胞リンパ腫、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、及びワルデンシュトレーム型（Ｗａｌｄｅｎｓｔｒｏｍ）マクログロブリン血症を含む）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、有毛細胞性白血病、慢性骨髄芽球性白血病、移植後リンパ増殖性疾患（ＰＴＬＤ）、並びに母斑症（ｐｈａｋｏｍａｔｏｓｅｓ）、水腫（例えば、脳腫瘍に関する）及びメイグス（Ｍｅｉｇｓ）症候群に関する血管異常増殖を含む。

【００７７】

抗体

本発明は、多種類の疾患の治療、予防及び／又は診断に使用することができる新規な抗体分子を提供する。

【００７８】

本発明の二重特異性抗体は、ＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合部位と、ＣＤ２０に特異的に結合する第２の抗原結合部位とを含む。そのような抗体は、本明細書では、例えば、「抗ＣＤ３／抗ＣＤ２０」若しくは「抗ＣＤ３×ＣＤ２０」若しくは「ＣＤ３×ＣＤ２０」二重特異性分子、又は他の類似の用語と呼ばれてもよい。

【００７９】

「抗ＣＤ３抗体」「抗ＣＤ３」「ＣＤ３抗体」又は「ＣＤ３に結合する抗体」という用語は、上記抗体がＣＤ３を標的とする診断剤及び／又は治療剤として使用され得るように、十分な親和性でＣＤ３タンパク質又はそのフラグメントに結合できる抗体を指す。

【００８０】

「抗ＣＤ２０抗体」「抗ＣＤ２０」「ＣＤ２０抗体」又は「ＣＤ２０に結合する抗体」という用語は、上記抗体がＣＤ２０を標的とする診断剤及び／又は治療剤として使用され得るように、十分な親和性でＣＤ２０タンパク質又はそのフラグメントに結合できる抗体を指す。

【００８１】

幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体は、以下のポリペプチド鎖を含む：

（１）ＣＤ２０のドメインに結合する、式（Ｉ）及び式（ＩＩ）に示されるポリペプチド鎖：

ＶＨ１－ＣＨ１－Ｆｃ１　　式（Ｉ）、

ＶＬ１－ＣＬ　　式（ＩＩ）、

（２）ＣＤ２０及びＣＤ３のドメインに結合する、式（ＩＩＩ）及び式（ＩＩ－２）に示されるポリペプチド鎖：

ＶＨ１－ＣＨ１－Ｌ－ＶＬ２－Ｌ－ＶＨ２－Ｌ－Ｆｃ２　　式（ＩＩＩ）、

ＶＬ１－ＣＬ　　式（ＩＩ－２）、

そのうち、ＶＨは重鎖可変領域を表し、ＶＬは軽鎖可変領域を表し、ＦｃはＣＨ２及びＣＨ３を含み、ＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３は、それぞれ重鎖定常領域のドメイン１、２及び３を表し、ＶＬは軽鎖可変領域を表し、ＣＬは軽鎖定常領域を表し、Ｌは連結ペプチドを表し、各連結ペプチドは、相同又は相異であり、任意選択的に、ＣＨ１とＦｃ１との間にヒンジ領域が存在し、

式（Ｉ）、（ＩＩ）、（ＩＩ－２）及び（ＩＩＩ）は、Ｎ末端からＣ末端まで順次連結

され、
ＶＨ１及びＶＬ１により形成される抗原結合部位はＣＤ２０に結合し、且つＶＬ２及びＶＨ２により形成される抗原結合部位はＣＤ３に結合する。幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体ＴＺＴ６は上記構造を有する。
【００８２】
幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体は、以下のポリペプチド鎖を含む：
（１）ＣＤ２０のドメインに結合する、式（Ｉ）及び式（ＩＩ）に示されるポリペプチド鎖：
ＶＨ１－ＣＨ１－Ｆｃ１　式（Ｉ）、
ＶＬ１－ＣＬ　式（ＩＩ）、
（２）ＣＤ３のドメインに結合する、式（ＩＶ）に示されるポリペプチド鎖：
ＶＬ２－Ｌ－ＶＨ２－Ｌ－Ｆｃ２　式（ＩＶ）。
【００８３】
そのうち、ＶＨは重鎖可変領域を表し、ＶＬは軽鎖可変領域を表し、ＦｃはＣＨ２及びＣＨ３を含み、ＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３は、それぞれ重鎖定常領域のドメイン１、２及び３を表し、ＶＬは軽鎖可変領域を表し、ＣＬは軽鎖定常領域を表し、Ｌは連結ペプチドを表し、各連結ペプチドは、相同又は相異であり、任意選択的に、ＣＨ１とＦｃ１との間にヒンジ領域が存在し、
式（Ｉ）、（ＩＩ）及び（ＩＶ）は、Ｎ末端からＣ末端まで順次連結され、
ＶＨ１及びＶＬ１により形成される抗原結合部位はＣＤ２０に結合し、且つＶＬ２及びＶＨ２により形成される抗原結合部位はＣＤ３に結合する。幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体ＴＺＴ７は上記構造を有する。
【００８４】
幾つかの実施形態において、本発明に記載の連結ペプチドは、アミノ酸配列（ＧＧＧＧＳ）ｎを含み、そのうち、ｎは、それぞれ１、２、３、４、５又は６から独立的に選択され、好ましくは、ｎは、それぞれ、２、３又は４から独立的に選択される。
【００８５】
幾つかの実施形態において、本発明に記載のＶＨ１は、アミノ酸配列がそれぞれ配列番号１、配列番号２及び配列番号３に示されるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２及びＨＣＤＲ３を含み、及び上記ＶＬ１は、アミノ酸配列がそれぞれ配列番号４、配列番号５及び配列番号６に示されるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３を含む。
【００８６】
幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体において、
上記ＶＨ１は、配列番号７に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号７に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び
上記ＶＬ１は、配列番号８に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号８に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【００８７】
幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体において、上記ＶＨ２は、アミノ酸配列がそれぞれ配列番号９、配列番号１０及び配列番号１１に示されるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２及びＨＣＤＲ３を含み、及び上記ＶＬ２は、アミノ酸配列がそれぞれ配列番号１２、配列番号１３及び配列番号１４に示されるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３を含む。
【００８８】
幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体において、
上記ＶＨ２は、配列番号１５に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号１５に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９

６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び
上記ＶＬ２は、配列番号１６に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号１６に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００８９】

幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体において、
式（Ｉ）のポリペプチド鎖は、配列番号１７若しくは２３に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号１７若しくは２３に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び
式（ＩＩ）及び式（ＩＩ－２）のポリペプチド鎖は、配列番号１８に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号１８に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００９０】

幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体において、式（ＩＩＩ）のポリペプチド鎖は、配列番号１９に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号１９に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００９１】

幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体において、式（ＩＶ）のポリペプチド鎖は、配列番号２０に示されるアミノ酸配列を含むか、又は配列番号２０に示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００９２】

幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体において、式（Ｉ）のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は配列番号２３に示され、式（ＩＩ）及び式（ＩＩ－２）のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は配列番号１８に示され、及び式（ＩＩＩ）のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は配列番号１９に示される。

【００９３】

幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体において、式（Ｉ）のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は配列番号１７に示され、式（ＩＩ）のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は配列番号１８に示され、及び式（ＩＶ）のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は配列番号２０に示される。

【００９４】

幾つかの実施形態において、本発明の抗体分子はヒト化されている。抗体をヒト化するための異なる方法は、Ａｌｍａｇｒｏ＆Ｆｒａｎｓｓｏｎによって概説されるように当業者に知られており、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる（Ａｌｍａｇｒｏ ＪＣ及びＦｒａｎｓｓｏｎ Ｊ （２００８） Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ ｉｎ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ１３：１６１９－１６３３）。

【００９５】

幾つかの実施形態において、本発明の抗体分子は、ヒト抗体又はヒト化抗体である。ヒト抗体又はヒト化抗体は、本分野で知られている各種の技術を用いて調製することができる。

【００９６】

幾つかの実施形態において、本発明の抗体分子はキメラ抗体である。

【００９７】

幾つかの実施形態において、本発明の抗体分子のフレームワーク配列の少なくとも一部は、ヒトコンセンサスフレームワーク配列である。一実施形態において、本発明の抗体分子は、

Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）2、Ｆｖ、ｓｃＦｖ又はｓｄＡｂという抗体フラグメントなど、その抗原結合フラグメントを更に包含する。

【００９８】

本発明は、複数株の抗ヒトＣＤ３抗体に詳細な分析及び比較を行い、配列を最適化してヒト化改造を行い、ヒト化抗体ＪＳＣＤ３を得る。

【００９９】

本発明に記載のヒト化抗ＣＤ３抗体は、二重特異性抗体の調製に使用される場合、より強い腫瘍殺傷活性を示す。本発明に開示されたこのヒト化配列は、他社のヒト化配列よりも多くの利点及び特徴を有し、抗腫瘍新薬の調製に使用されるとより高い殺腫瘍活性を示し、且つ物理化学的安定性も大幅に向上し、抗腫瘍薬のスクリーニング及び開発により適しており、この創造的な成果は、本発明の有益な効果及び非常に高い医療応用価値を構成する。

【０１００】

本発明に記載の抗体の可変領域ＣＤＲの正確なアミノ酸配列の境界は、多くの公知の解決案の何れかにより決定することができ、抗体の立体構造及びＣＤＲリングのトポロジーに基づくＣｈｏｔｈｉａ（Ｃｈｏｔｈｉａら（１９８９）Ｎａｔｕｒｅ ３４２：８７７‐８８３；Ａｌ‐Ｌａｚｉｋａｎｉら、「Ｓｔａｎｄａｒｄ ｃｏｎｆｏｒｍａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｃａｎｏｎｉｃａｌ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎｓ」，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，２７３，９２７‐９４８（１９９７））、抗体配列の可変性に基づくＫａｂａｔ（Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，４ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ（１９８７））、ＡｂＭ（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｂａｔｈ）、Ｃｏｎｔａｃｔ（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｃｏｌｌｅｇｅ Ｌｏｎｄｏｎ）、国際的ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ ｄａｔａｂａｓｅ（ＩＭＧＴ）（１９９９ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２７，２０９‐２１２）、及び大量の結晶構造が利用されるアフィニティ伝播クラスタリング（ａｆｆｉｎｉｔｙ ｐｒｏｐａｇａｔｉｏｎ ｃｌｕｓｔｅｒｉｎｇ）に基づくＮｏｒｔｈ ＣＤＲ定義を含む。

【０１０１】

特に断らない限り、本発明の抗体のＣＤＲは、当業者が当該分野の何れかの解決案（例えば、異なる割り当てシステム又は組み合わせ）に基づいて境界を決定することができる。

【０１０２】

幾つかの実施形態において、本明細書に記載のアミノ酸変化は、アミノ酸の欠失、挿入又は置換を含む。好ましくは、本明細書に記載のアミノ酸変化は、アミノ酸置換、好ましくは保存的置換である。

【０１０３】

好ましい実施形態において、本発明に記載のアミノ酸変化は、ＣＤＲ外の領域（例えば、ＦＲ）で生じる。より好ましくは、本発明に記載のアミノ酸変化は、重鎖可変領域外及び／又は軽鎖可変領域外の領域で起こる。

【０１０４】

幾つかの実施形態において、置換は保存的置換である。保存的置換は、１つのアミノ酸が同じクラス内の別のアミノ酸で置換されることを指し、例えば、１つの酸性アミノ酸が別の酸性アミノ酸で置換され、１つの塩基性アミノ酸が別の塩基性アミノ酸で置換され、又は１つの中性アミノ酸が別の中性アミノ酸で置換される。

【０１０５】

幾つかの実施形態において、本発明の二重特異性抗体又はその抗原結合フラグメントは、アミノ酸の欠失、挿入又は置換によって変異されているが、依然として上記抗体（特に、上記配列に説明されたＣＤＲ領域において）と少なくとも約９０％、９１％、９２％、

９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有するそれらの抗体を含む。幾つかの実施形態において、本発明の抗体は、具体的な配列で説明されたＣＤＲ領域と比べる場合、ＣＤＲ領域にアミノ酸の欠失、挿入又は置換を行ったアミノ酸変異が１、２、３、４又は５個を超えない。

【０１０６】

幾つかの実施形態において、本明細書に提供される抗体のＦｃ領域に１つ又は複数のアミノ酸修飾を導入してＦｃ領域の変異体を産生することができる。Ｆｃ領域の変異体は、１つ又は複数のアミノ酸位置にアミノ酸修飾（例えば、置換、欠失又は挿入）が含まれるヒトＦｃ領域配列（例えば、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４のＦｃ領域）を含んでもよい。

【０１０７】

幾つかの実施形態において、抗体のシステイン残基の数を変化させることにより、抗体特性を修飾することができる。例えば、ＣＨ１のヒンジ領域を修飾することにより、修飾は、ヒンジ領域内のシステイン残基の数を変化させる（例えば、増加させる又は減少させる）。

【０１０８】

「Ｋｎｏｂ　ｉｎｔｏ　Ｈｏｌｅ構造」という用語は、抗体ＦｃのＣＨ３の疎水性アミノ酸を変異させることである。疎水性作用力を強化するために、１つの鎖ＣＨ３の側鎖アミノ酸を変異させて分子が比較的大きい疎水性アミノ酸（ｋｎｏｂ）を形成し、立体障害を減少させるために、もう１つのＣＨ３側鎖アミノ酸を変異させて小さなアミノ酸（ｈｏｌｅ）を形成し、変異後にＫｎｏｂを有するＣＨ３及びＨｏｌｅを有するＣＨ３は、疎水性作用の形でＫｎｏｂ　ｉｎｔｏ　Ｈｏｌｅ構造（ＫｉＨ）を形成し、重鎖ヘテロ二量体の形成に役立ち、ＫｉＨ変異は、主にＣＨ３ドメインの空間構造の内部疎水性アミノ酸に発生し、変異後に外部に露出したアミノ酸はほとんど変化しないため、Ｆｃのエフェクター機能や引き起こされた免疫原性に影響を与えない。「ｋｎｏｂ－Ｆｃ」という用語は、ｋｎｏｂに似た空間構造を形成するために抗体Ｆｃ領域にＴ３６６Ｗを含む点変異を指す。それに応じて、「ｈｏｌｅ－Ｆｃ」は、ｈｏｌｅに似た空間構造を形成するために抗体Ｆｃ領域にＴ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖを含む点変異を指す。ヘテロ二量体の形成を更に促進するために、更にｋｎｏｂ－Ｆｃ及びｈｏｌｅ－ＦｃにそれぞれＳ３５４Ｃ及びＹ３４９Ｃの点変異を導入することができ、ジスルフィド結合によってヘテロ二量体の形成を更に促進する。同時に、プロテインＡとの結合を弱めるために、更にｈｏｌｅ－ＦｃにそれぞれＨ４３５Ｒ及びＹ４３６Ｆの点変異を導入することができる。

【０１０９】

本発明の二重特異性抗体は、２つのＦｃ領域を含むことができ、各Ｆｃ領域は、単独の抗体重鎖の一部である。式（Ｉ）におけるＦｃ１及び式（ＩＩＩ）又は式（ＩＶ）におけるＦｃ２は、ヘテロ二量体（即ち、二重特異性）分子の精製を促進するか、又は容易にするように意図されたＣＨ３ドメインにおける変異を有することを除いて、同じ配列を有することができる。

【０１１０】

幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体において、上記式（Ｉ）と式（ＩＩ）の間、式（ＩＩＩ）と式（ＩＩ－２）の間は、ジスルフィド結合によって連結されている。

【０１１１】

幾つかの実施形態において、二重特異性抗体の式（Ｉ）と式（ＩＩＩ）との間は、直接的又は間接的に互いに連結されてもよい。幾つかの実施形態において、二重特異性抗体の式（Ｉ）と式（ＩＩＩ）との間は、リンカーによって互いに連結されてもよい。幾つかの実施形態において、リンカーはペプチドリンカーである。

【０１１２】

幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体の式（Ｉ）と式（ＩＩＩ）又は式（ＩＶ）との間は、Ｆｃ領域のジスルフィド結合及びＣＨ３ドメインのＫｎｏｂ

ｉｎｔｏ　Ｈｏｌｅ構造によって連結されている。好ましくは、式（Ｉ）におけるＦｃ１はｋｎｏｂ－Ｆｃであり、式（ＩＩＩ）又は式（ＩＶ）におけるＦｃ２はｈｏｌｅ－Ｆｃであり、又は式（Ｉ）におけるＦｃ１はｈｏｌｅ－Ｆｃであり、式（ＩＩＩ）又は式（ＩＶ）におけるＦｃ２はｋｎｏｂ－Ｆｃである。

【０１１３】

幾つかの実施形態において、本発明に記載の二重特異性抗体において、上記式（Ｉ）におけるＣＨ１－Ｆｃ１及び式（ＩＩＩ）におけるＦｃ２は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３若しくはＩｇＧ４などのＩｇＧの形態であり、及び／又は式（ＩＩ）及び式（ＩＩ－２）におけるＣＬは、λ若しくはκ鎖由来である。

【０１１４】

本発明の二重特異性抗体のＦｃ領域は、ヒトＦｃ領域であってもよい。本発明の二重特異性抗体のＦｃ領域は、任意のアイソタイプであってもよく、

ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４を含むがこれらに限定されない。幾つかの実施形態において、上記第１及び上記第２の抗体のＦｃ領域は、何れもＩｇＧ１アイソタイプである。幾つかの実施形態において、上記第１及び上記第２の抗体のＦｃ領域は、何れもＩｇＧ４アイソタイプである。幾つかの実施形態において、上記抗体のＦｃ領域の一方はＩｇＧ１アイソタイプであり、他方はＩｇＧ４アイソタイプである。後者の実施形態において、得られた二重特異性抗体は、ＩｇＧ１のＦｃ領域及びＩｇＧ４のＦｃ領域を含み、従って、エフェクター機能の活性化に関して興味深い中間特性を有し得る。

【０１１５】

幾つかの実施形態において、本明細書で提供される抗体は、本分野で知られ且つ容易に入手できる他の非タンパク質部分を含有するように更に修飾されてもよい。抗体の誘導体化に適した部分は、水溶性ポリマーを含むが、これらに限定されない。水溶性ポリマーの非限定的な例は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、エチレングリコール／プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ－１，３－ジオキサン、ポリ－１，３，６－トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマー又はランダムコポリマー）、及びデキストラン又はポリ（ｎ－ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセリン）、ポリビニルアルコール、及びそれらの混合物を含むが、これらに限定されない。

【０１１６】

抗体発現

更に別の様態において、本発明は、上記何れかの抗体若しくはそのフラグメント、又はその鎖の何れかをコードする核酸を提供する。一実施形態において、上記ポリヌクレオチドは、抗体の軽鎖可変領域及び／又は重鎖可変領域のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含んでもよく、或いは抗体の軽鎖及び／又は重鎖のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含んでもよい。

【０１１７】

幾つかの実施形態において、本発明の核酸は、配列番号１～２０の何れか１つに示されるアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列をコードする核酸、又は配列番号１～２０の何れか１つに示されるアミノ酸配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸を含む。

【０１１８】

更に別の様態において、本発明は、本明細書に記載の核酸を含む発現ベクターであって、好ましくは、上記ベクターが真核生物発現ベクターである、発現ベクターを提供する。幾つかの実施形態において、本明細書に記載の核酸は、１つ又は複数の発現ベクターに含まれる。ベクターは、ウイルス、プラスミド、コスミド、λファージ、又は酵母人工染色体（ＹＡＣ）を含むが、これらに限定されない。

【０１１９】
更に別の様態において、本発明は、本明細書に記載の核酸又は本明細書に記載の発現ベクターを含む宿主細胞であって、好ましくは、上記宿主細胞は真核細胞であり、より好ましくは、哺乳動物細胞（例えば、ＣＨＯ細胞又は２９３細胞）である、宿主細胞を提供する。別の実施形態において、宿主細胞は原核である。
【０１２０】
一実施形態において、本発明は、本発明の抗ＣＤ３×ＣＤ２０二重特異性抗体を調製する方法であって、そのうち、上記方法は、発現ベクターを哺乳動物宿主細胞に導入する場合、宿主細胞を十分な時間で培養することで、抗体が宿主細胞に発現すること、或いはより好ましくは抗体が宿主細胞の成長培地に分泌することを可能にするように、抗体を産生することを含む、方法を提供する。標準タンパク質精製方法により培地から抗体を回収することができる。
【０１２１】
本発明は、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ＡＴＣＣ）から得られる多くの不死化細胞系を含む、本発明の組換え抗体を発現するための哺乳動物宿主細胞を提供する。特に、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＮＳ０、ＳＰ２／０細胞、ＨｅＬａ細胞、ベビーハムスター腎臓（ＢＨＫ）細胞、サル腎臓細胞（ＣＯＳ）、ヒト肝細胞癌細胞、Ａ５４９細胞、２９３Ｔ細胞及び多くの他の細胞系を含む。哺乳動物宿主細胞は、ヒト、マウス、ラット、イヌ、サル、ブタ、ヤギ、ウシ、ウマ及びハムスターの細胞を含む。どの細胞系が高発現レベルを有するかを測定することにより、特に好ましい細胞系を選択する。
【０１２２】
異なる細胞系で発現されるか、又は遺伝子組換え動物において発現される抗体同士が異なるグリコシル化を示す可能性がある。しかし、本明細書により提供される核酸分子によりコードされるか、又は本明細書により提供されるアミノ酸配列を含む全ての抗体は、抗体のグリコシル化にも関わらず、本発明の構成部分である。同様に、幾つかの実施形態において、非フコシル化抗体の糖構造が天然ヒト血清ＩｇＧの一般的な成分であるため、通常、インビトロ及びインビボにおいてそのフコシル化対応物より更に強力な効果を有し、且つ免疫原性である可能性がないことから、非フコシル化抗体が有利である。
【０１２３】
医薬組成物及び薬剤製剤
更に別の様態において、本発明は、本明細書に記載の抗ＣＤ３×ＣＤ２０二重特異性抗体又はその抗原結合フラグメントと、薬学的に許容される担体又は賦形剤とを含む医薬組成物を提供する。
【０１２４】
本発明により提供される抗ＣＤ３×ＣＤ２０抗体又はその医薬組成物は、製剤のうちの適切な担体、賦形剤及びその他の試薬を組み合わせて併用投与することで、改善された転移、送達、耐性などを提供できると理解すべきである。
【０１２５】
「医薬組成物」という用語は、それに含まれる活性成分の生物学的活性が有効的な形態で存在することを可能にし、且つ上記製剤を投与する受検者に対して許容できない毒性を有するその他の成分を含まない製剤を指す。
【０１２６】
所望の純度を有する本発明の抗ＣＤ３×ＣＤ２０二重特異性抗体を１つ又は複数の任意選択的な薬用添加物（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、１６ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ、ｅｄｉｔｅｄ ｂｙ Ｏｓｏｌ，Ａ．（１９８０））と混合することにより、本明細書に記載の抗ＣＤ３×ＣＤ２０二重特異性抗体を含む薬剤製剤を調製することができ、好ましくは、水溶液又は凍結乾燥製剤の形態である。
【０１２７】
本発明の医薬組成物又は製剤は、１つ又は複数のその他の活性成分を更に含んでもよく

、上記活性成分は、治療される特定の適応症にとって必要とされるものであり、好ましくは、互いに悪い影響を与えない相補性活性のような活性成分を有する。幾つかの実施形態において、他の活性成分は、化学療法剤、免疫チェックポイント阻害剤、成長阻害剤、抗生物質又は既知の各種の抗腫瘍剤又は抗癌剤であり、上記活性成分は、目的の用途に有効な量の適切な組み合わせで存在する。

【０１２８】

幾つかの実施形態において、本発明の医薬組成物は、抗ＣＤ３×ＣＤ２０二重特異性抗体をコードする核酸の組成物を更に含む。

【０１２９】

更に別の様態において、本発明は、本明細書に記載の抗ＣＤ３×ＣＤ２０二重特異性抗体若しくはその抗原結合フラグメント、又は本明細書に記載の医薬組成物、及び１つ又は複数の別の治療剤、を含む薬剤の組み合わせを提供する。

【０１３０】

更に別の様態において、本発明は、本明細書に記載の抗体若しくはその抗原結合フラグメント、本明細書に記載のポリヌクレオチド、本明細書に記載の発現ベクター、本明細書に記載の宿主細胞、又は本明細書に記載の医薬組成物を含む、試薬キットを提供する。

【０１３１】

医薬用途

更に別の様態において、本発明は、癌を予防及び／又は治療するための薬剤の調製における、本明細書に記載の抗ＣＤ３×ＣＤ２０二重特異性抗体若しくはその抗原結合フラグメント、又は本明細書に記載の医薬組成物の使用を提供する。

【０１３２】

更に別の様態において、本発明は、癌を予防及び／又は治療するための、本明細書に記載の抗ＣＤ３×ＣＤ２０二重特異性抗体若しくはその抗原結合フラグメント、又は本明細書に記載の医薬組成物を提供する。

【０１３３】

更に別の様態において、本発明は、癌を予防及び／又は治療する方法であって、それを必要とする受検者に、本明細書に記載の抗ＣＤ３×ＣＤ２０二重特異性抗体、又は本明細書に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法を提供する。

【０１３４】

幾つかの実施形態において、本発明に記載の癌は、急性Ｂリンパ球性白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、濾胞性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、慢性骨髄性白血病、又はＢｕｒｋｉｔｔリンパ腫から選択される。

【０１３５】

受検者は、霊長類などの哺乳動物であってもよく、好ましくは、ヒト（例えば、本明細書に記載の疾患を有する、又は本明細書に記載の疾患を有するリスクがある患者）などの高度霊長類である。一実施形態において、受検者は、本明細書に記載の疾患（例えば、本明細書に記載の腫瘍）を有するか、又は本明細書に記載の疾患を有するリスクがある。幾つかの実施形態において、受検者は、化学療法及び／又は放射線療法などの他の治療を受けているか、又は受けたことがある。

【０１３６】

幾つかの実施形態において、本発明の投与方式は、経口投与、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、動脈内投与、関節内投与（例えば、関節炎に罹った関節において）、吸入、エアロゾル送達又は腫瘍内投与などを含むが、これらに限定されない。

【０１３７】

幾つかの実施形態において、本発明は、受検者に治療有効量で併用投与する１つ又は複数の療法（例えば、治療法及び／又はその他の治療剤）を提供する。

【０１３８】

幾つかの実施形態において、本発明により提供される方法又は使用は、個体に１つ又は複数の療法（例えば、治療法及び／又はその他の治療剤）を投与することを更に含む。本

発明の抗体は、単独で又は療法のうちの他の治療剤との組み合わせで使用されてもよい。例えば、少なくとも１つの別の治療剤と併用投与されてもよい。

【０１３９】

幾つかの実施形態において、上記治療方式は、外科手術、放射線療法、局所照射又は集束照射などを含む。幾つかの実施形態において、上記治療剤は、化学療法剤、細胞傷害性剤、ワクチン、他の抗体、抗感染活性剤又は免疫調節剤から選択される。

【０１４０】

診断及び検出に使用される方法

更に別の様態において、本発明は、本明細書に記載の任意の抗体又はその抗原結合フラグメントを利用して試料におけるＣＤ３又はＣＤ２０の存在を検出する方法を提供する。本明細書で使用される「検出」という用語は、定量的検出又は定性的検出を含む。例示的な検出方法は、免疫組織化学、免疫細胞化学、フローサイトメトリー（例えば、ＦＡＣＳ）、抗体分子複合体化磁気ビーズ、ＥＬＩＳＡ測定法、ＰＣＲ－技術（例えば、ＲＴ－ＰＣＲ）に関してもよい。幾つかの実施形態において、上記試料は生物試料である。幾つかの実施形態において、生物試料は、血、血清又は生物に由来する他の液体試料である。幾つかの実施形態において、生物試料は細胞又は組織を含む。幾つかの実施形態において、生体試料は、過剰増殖性又は癌性病変に由来する。

【０１４１】

一様態において、本発明は、血清、精液若しくは尿、又は組織生検試料（例えば、過剰増殖性又は癌性病変に由来する）などの生体試料におけるＣＤ３又はＣＤ２０抗原の存在をインビトロ又はインビボで検出するための診断方法を提供する。当該診断方法は、１）相互作用の発生を可能にする条件で試料（及び任意選択的で対照試料）を、本明細書に記載されるような抗体分子と接触させるか、又は受検者に上記抗体分子を投与するステップと、２）上記抗体分子と試料（及び任意選択的で対照試料）との間の複合物の形成を検出するステップとを含む。複合物の形成は、関連抗原の存在を示し、且つ本明細書に記載の治療及び／又は予防の適用性又は必要性を示し得る。

【０１４２】

幾つかの実施形態において、本発明は、本明細書に記載の抗体分子若しくはその抗原結合フラグメント、又は本明細書に記載の医薬組成物及び使用説明書を含む診断試薬キットを提供する。

【０１４３】

本発明は説明される特定の実施形態の全ての組み合わせを含む。本発明のさらなる実施形態及び適用可能な完全範囲は、下記に提供される詳細な説明により明らかになる。しかし、本発明の好適な実施形態を詳細な説明及び特定の実施例で示したが、これらの説明及び実施例は、本発明の精神及び範囲内にある各種の変更及び修正がこの詳細な説明により当業者にとって明らかになるため、説明の方式だけにより提供されると理解すべきである。全ての目的のために、前言を含む本明細書で引用される全ての開示物、特許及び特許出願は、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１４４】

本発明は下記の略語を採用する。

【０１４５】

ｈｉｓ‐ｔａｇはヒスチジンタグを表す。

【０１４６】

Ｆｃ　ｔａｇは結晶性フラグメントタグを表す。

【０１４７】

ＥＣＤは細胞外ドメインを表す。

【０１４８】

ＰＥＩはポリエチレンイミンを表す。

【０１４９】

ＢＳＡはウシ血清アルブミンを表す。

【０１５０】
ＰＢＳはリン酸緩衝生理食塩水を表す。
【０１５１】
ＦＢＳはウシ胎児血清を表す。
【０１５２】
ＣＦＳＥはカルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステルを表す。
【０１５３】
ＡＰＣはアロフィコシアニンを表す。
【０１５４】
ＮＡ－ＰＥはフィコエリトリンで標識される中性アビジンを表す。
【０１５５】
ＰＥはフィコエリトリンを表す。
【０１５６】
ＴＭＢは３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジンを表す。
【０１５７】
ＰＢＳＴはリン酸塩Ｔｗｅｅｎ緩衝液を表す。
【０１５８】
実施例
下記実施例によって本発明を説明するが、本発明を何ら限定することは意図しない。本明細書は、既に本発明について詳しく説明し、そのうち、その具体的な実施形態も開示した。当業者にとっては、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、本発明の具体的な実施形態に対して各種の変化及び改良を行うことが明らかである。
【０１５９】
実施例１、二重特異性抗体分子の発現ベクターの構築
１．１　抗ＣＤ３抗体
本発明は、複数株の抗ヒトＣＤ３抗体を分析し、そしてそのうちの１つのマウス抗体ＳＰ３４に対して配列を最適化してヒト化改造を行い、ヒト化抗ＣＤ３抗体ＪＳＣＤ３が得られた。
【０１６０】
ＳＰ３４は、重鎖アミノ酸配列が配列番号２４であり、軽鎖アミノ酸配列が配列番号２５である、ヒトＣＤ３に対するマウスモノクローナル抗体である。
【０１６１】
ヒト化抗ＣＤ３抗体ＪＳＣＤ３のアミノ酸配列は以下の通りである：
その重鎖相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２及びＨＣＤＲ３のアミノ酸配列がそれぞれ配列番号９、１０及び１１に示される、ＪＳＣＤ３　ＶＨ：配列番号１５。
【０１６２】
その軽鎖相補性決定領域ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３のアミノ酸配列がそれぞれ配列番号１２、１３及び１４に示されるＪＳＣＤ３　ＶＬ：配列番号１６。
【０１６３】
ＪＳＣＤ３の全長アミノ酸配列は以下の通りである：
ＪＳＣＤ３　ＨＣ：配列番号２１
ＪＳＣＤ３　ＬＣ：配列番号２２
【０１６４】
１．２　二重特異性抗体分子の発現ベクターの構築
二重特異性抗体分子ＴＺＴ６：
ＨＸＴ２－ＪＳ　ＣＤ２０　ＬＣ－２、ＨＸＴ４ｓ－ＪＳ　ＣＤ２０　ＨＣ－２ｂ及びＨＸ４－ＪＳＣＤ３ＳｃＦｖ　ＮＶＬ－Ｍｕｔを同時に一過性発現させることによって得られ、発現ベクターの構築は順に以下の通りである：ＪＳＣＤ２０　ＬＣ－２をコードする遺伝子の合成をＧｅｎＳｃｒｉｐｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎに委託し、ＢＳＰＱＩにより酵素切断してＨＸＴ２ベクター（ｐＣＤＮＡ３．１由来の、君実生

物により自律的に改変されたベクター）に連結し、第１の発現ベクターＨＸＴ２－ＪＳＣＤ２０　ＬＣ－２が得られた。ＪＳＣＤ２０　ＬＣ－２をコードする遺伝子の合成をＧｅｎＳｃｒｉｐｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎに委託し、ＨｉｎｄＩＩＩ及びＮｈｅＩにより酵素切断してＨＸＴ４ｓ－Ｍｕｔ－ｂ（ｐＣＤＮＡ３．１由来の、君実生物により自律的に改変されたベクター）に連結し、第２の発現ベクターＨＸＴ４ｓ－ＪＳ　ＣＤ２０　ＨＣ－２ｂが得られた。ＪＳＣＤ３ＳｃＦｖをコードする遺伝子の合成をＧｅｎＳｃｒｉｐｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎに委託し、ＨｉｎｄＩＩＩ及びＮｈｅＩにより酵素切断してＨＸ４－ＦＣ－ｍｕｔ－ｈベクター（ｐＣＤＮＡ３．１由来の、君実生物により自律的に改変されたベクター）に連結し、第３の発現ベクターＨＸ４－ＪＳＣＤ３ＳｃＦｖ　ＮＶＬ－Ｍｕｔ　ｈが得られた。

【０１６５】

二重特異性抗体分子ＴＺＴ７：

ＨＸＴ２－ＪＳ　ＣＤ２０　ＬＣ－２、ＨＸＴ４ｓ－ＪＳ　ＣＤ２０　ＨＣ－２　Ｍｕｔ　ｈ及びＨＸ４－ＪＳ　ＣＤ２０　ＨＣ－２　ＪＳ　ＣＤ３ＳｃＦｖ　ＮＶＬ－Ｇ４　ＦＣ　ｂ　Ｖ２を同時に一過性発現させることによって得られ、発現ベクターの構築は順に以下の通りである：ＪＳＣＤ２０　ＬＣ－２をコードする遺伝子の合成をＧｅｎＳｃｒｉｐｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎに委託し、ＢＳＰＱＩにより酵素切断してＨＸＴ２ベクターに連結し、第一の発現ベクターＨＸＴ２－ＪＳ　ＣＤ２０　ＬＣ－２が得られた。ＪＳＣＤ２０　ＨＣ－２をコードする遺伝子の合成をＧｅｎＳｃｒｉｐｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎに委託し、ＨｉｎｄＩＩＩ及びＮｈｅＩにより酵素切断してＨＸＴ４ｓ－Ｍｕｔ－ｈに連結し、第２の発現ベクターＨＸＴ４ｓ－ＪＳ　ＣＤ２０　ＨＣ－２　ｈが得られた。ＪＳＣＤ３ＳｃＦｖをコードする遺伝子の合成をＧｅｎＳｃｒｉｐｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎに委託し、ＨｉｎｄＩＩＩ及びＮｈｅＩにより酵素切断してＨＸ４－ＪＳＣＤ２０ＨＣ－２－Ｇ４　ＦＣ　ｍｕｔ　ｂベクターに連結し、第３の発現ベクターＨＸ４－ＪＳ　ＣＤ２０　ＨＣ－２　ＪＳ　ＣＤ３ＳｃＦｖ　ＮＶＬ－Ｇ４　ＦＣ　ｂ　Ｖ２が得られた。

【０１６６】

実施例２、二重特異性抗体分子の発現及び精製

２．１　二重特異性抗体分子の発現

二重特異性抗体分子ＴＺＴ６及びＴＺＴ７の一過性発現及び精製：上記で構築した３つのプラスミドをエンドトキシン制御試薬キットを用いて大抽出し、後続の哺乳動物細胞の発現に使用した。培養中のＣＨＯ－Ｋ１細胞（細胞が一過性発現に適するようにゲノムレベルで改変した）を計数し、細胞密度が２～６×１０^{6}／ｍＬである場合にＣＤ　ＣＨＯ培地で継代増幅を行い、トランスフェクションの前日に細胞密度を１．５～２．０×１０^{6}／ｍＬに希釈し、翌日に細胞密度が約３．５×１０^{6}／ｍＬに達した時にトランスフェクションを行った。まず、トランスフェクション体積の１０分の１の培地を加え、次に、１～２μｇ／ｍＬのトランスフェクション体積のプラスミドを加え、最後に３～１４μｇ／ｍＬのＰＥＩを加え、均一に混合した後に室温でインキュベートし、時間が３０分間を超えず、最後にトランスフェクション混合物を予め処理した細胞にゆっくりと加え、加えながら均一に混合した。トランスフェクション混合物をシェーカーに入れて３６．５℃、１２０ｒｐｍ、７％CO_2の培養条件で培養した。培養周期は、トランスフェクション後の６～１０日であり、２日ごとに１回補給した。

【０１６７】

２．２　二重特異性抗体分子の精製

上記トランスフェクション混合物の培養終了後、１０００ｇで１０分間遠心分離して沈殿を捨てた後、１２０００ｇで３０分間遠心分離して細胞上清を収集し、無菌濾過を行った。ＡＫＴＡ　Ａｖａｎｔ精製装置で精製し、まず、０．１ＭのＮａＯＨでＰｒａｅｓｔｏ　Ｊｅｔｔｅｄ　Ａ５０親和性充填剤を充填したカラムに対して１５～２０分間ＣＩＰを行い、次に、ＰＢＳ緩衝液で３～５ＣＶで平衡化した後に試料をローディングし、ローディング完了後にそれぞれアフィニティークロマトグラフィー溶出緩衝液で溶出し、最後

にｐＨ３．８の酢酸－酢酸ナトリウム緩衝液で目的タンパク質を溶離し、１ＭのＴｒｉｓ緩衝液で試料を中和し、ｐＨ５．５になるまで調節し、試料を残してＳＥＣ－ＨＰＬＣに送り、試料の純度を検出した。残りの試料を次のステップで精製し、弱カチオン性充填剤ＥＭＤ　ＣＯＯＭ充填剤を選択して精製し、平衡液はｐＨ５．５の５０ｍＭの酢酸－酢酸ナトリウム系であり、溶離液は、ｐＨ５．５の５０ｍＭの酢酸－酢酸ナトリウム＋１ＭのＮａＣｌ緩衝系であり、線形溶離方式により、目的タンパク質を収集し、最終的にＳＥＣ－ＨＰＬＣモノマーの純度は９５％以上に達することができ、それぞれ二重特異性抗体分子ＴＺＴ６及びＴＺＴ７が得られた。二重特異性抗体分子ＴＺＴ６の構造の模式図が図１ａに示され、二重特異性抗体分子ＴＺＴ７の構造の模式図が図１ｂに示される。

【０１６８】

二重特異性抗体分子ＴＺＴ６のアミノ酸配列は、下記の通りである：

ＨＣ１（ＨＸＴ４ｓ－ＪＳ　ＣＤ２０　ＨＣ－２　ｂ）：配列番号１７

ＬＣ（ＨＸＴ２－ＪＳ　ＣＤ２０　ＬＣ－２）：配列番号１８

ＨＣ２（ＨＸ４－ＪＳＣＤ３ＳｃＦｖ　ＮＶＬ－Ｍｕｔ　ｈ）：配列番号２０

二重特異性抗体分子ＴＺＴ７のアミノ酸配列は、下記の通りである：

ＨＣ１（ＨＸＴ４ｓ－ＪＳ　ＣＤ２０ＨＣ－２　Ｍｕｔ　ｈ）：配列番号２３

ＬＣ（ＨＸＴ２－ＪＳ　ＣＤ２０　ＬＣ－２）：配列番号１８

ＨＣ２（ＨＸ４－ＪＳ　ＣＤ２０　ＨＣ－２　ＪＳ　ＣＤ３ＳｃＦｖ　ＮＶＬ－Ｇ４ＦＣ　ｂ　Ｖ２）：配列番号１９。

【０１６９】

二重特異性抗体分子ＴＺＴ６及びＴＺＴ７のＣＤＲ及び可変領域アミノ酸配列を表１に示す。

【０１７０】

【表１】

表１：二重特異性抗体分子のＣＤＲ及び可変領域アミノ酸配列（ＫＡＢＡＴプロトコル）

		HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3	VH	VL
TZT6	HC1／LC	配列番号1	配列番号2	配列番号3	配列番号4	配列番号5	配列番号6	配列番号7	配列番号8
	HC2	配列番号9	配列番号10	配列番号11	配列番号12	配列番号13	配列番号14	配列番号15	配列番号16
TZT7	HC1／LC	配列番号1	配列番号2	配列番号3	配列番号4	配列番号5	配列番号6	配列番号7	配列番号8
	HC2／LC（CD20）	配列番号1	配列番号2	配列番号3	配列番号4	配列番号5	配列番号6	配列番号7	配列番号8
	HC2（CD3）	配列番号9	配列番号10	配列番号11	配列番号12	配列番号13	配列番号14	配列番号15	配列番号16

【０１７１】

実施例３、二重特異性抗体の安定性

３．１　二重特異性抗体の熱安定性

１、試験目的

本発明の二重特異性抗体の熱安定性を検出した。ＤＳＦ（示差走査蛍光技術）を用いて、従来の製剤（２０ｍＭのクエン酸－クエン酸ナトリウム緩衝液、５０ｍＭの塩化ナトリウム、１４０ｍＭのマンニトール、ｐＨ６．０）における二重特異性抗体の安定性を考察した。

【０１７２】

２、試験過程及び結果

抗体試料を上記緩衝液に加え、抗体試料の濃度を４ｍｇ／ｍＬ程度に制御し、ＤＳＦにより検出した。結果を表２に示し、上記緩衝液において、本発明の二重特異性抗体ＴＺＴ

６及びＴＺＴ７は、熱転移温度（Ｔｍ）が何れも６０℃以上であり、良好な熱安定性を示した。

【０１７３】

【表２】

表２　二重特異性抗体の熱安定性の測定

試料	Ｔｍ１（℃）	Ｔｍ２（℃）
ＴＺＴ６	６２．３	７２．７
ＴＺＴ７	６２．７	７５．１

【０１７４】

３．２　二重特異性抗体の高温安定性

１、試験目的

二重特異性抗体の安定性を高温条件下で考察した。

【０１７５】

２、試験過程及び結果

抗体試料をｐＨ６．０の緩衝系（２０ｍＭのクエン酸－クエン酸ナトリウム／５０ｍＭの塩化ナトリウム／１４０ｍＭのマンニトール）に加え、試料の濃度を約４ｍｇ／ｍＬに制御し、５００μＬ／本でバイアル瓶に分注した。４０℃のインキュベーターに入れ、０Ｗ、２Ｗ及び４Ｗの安定性を考察し、表３に従って試料を送って検出した。以下のパラメータによって安定性を評価した：（ａ）ＳＥＣ－ＨＰＬＣ（サイズ排除クロマトグラフィー）によって抗体のモノマー、ポリマー、又はフラグメントの含有量を測定し、（ｂ）２種類のＣＥ－ＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウムキャピラリー電気泳動）法によって抗体の分子量を検出し、（ｃ）ＥＬＩＳＡ法及びレポーター遺伝子法によって抗体の生物学的活性を検出する（実験方法は実施例４及び実施例８を参照する）。

【０１７６】

検出結果により、４０℃の高温で４週間放置しても、本発明の二重特異性抗体ＴＺＴ６及びＴＺＴ７は、純度（ＳＥＣ－ＨＰＬＣ法、Ｒ－ＣＥ－ＳＤＳ（還元電気泳動法）、ＮＲ－ＣＥ－ＳＤＳ（非還元電気泳動法））及び生物学的活性が何れも顕著に変化せず、良好な熱安定性を有することを示し、具体的な結果は表３に示される。

【０１７７】

【表３】

表３　４０℃の高温で４週間放置した期間における二重特異性抗体の安定性

試料	時間	ＳＥＣ－ＨＰＬＣ			ＮＲ－ＣＥ－ＳＤＳ	Ｒ－ＣＥ－ＳＤＳ	生物学的活性	
		凝集体	モノマー	フラグメント			相対結合活性Ｅｌｉｓａ（%）	相対細胞活性　レポーター遺伝子法（%）
ＴＺＴ６	０週間	１．２%	９７．６%	１．３%	９６．２%	９９．３%	１１９．４	９１
	２週間	１．８%	９６．４%	１．９%	９６．１%	９９．３%	１００．２	１１２
	４週間	２．２%	９６．０%	１．８%	９６．１%	９９．２%	１０４．３	１０５
ＴＺＴ７	０週間	１．３%	９８．６%	０．１%	９９．７%	９８．７%	１０１．９	９０
	２週間	１．６%	９７．１%	１．３%	９８．７%	９８．２%	９９．７	１０６
	４週間	２．２%	９６．１%	１．７%	９８．７%	９８．０%	１０２．１	７８

【０１７８】

実施例４：ＥＬＩＳＡによる二重特異性抗体とヒトＣＤ３εとの結合の検出

１、試験目的

ＥＬＩＳＡ法によって本発明の二重特異性抗体とヒトＣＤ３εとの結合を検出した。

【０１７９】

２、試験過程

ａ．　１．０μｇ／ｍＬ濃度の組換えヒトＣＤ３ε（Ｎｏｖｏｐｒｏｔｅｉｎ、Ｃ５７８）を抗原として１００μＬ／ウェルで９６ウェルプレートをコーティングし、３７℃で１．５時間インキュベートした。

【０１８０】

ｂ．　３００μＬ／ウェルで１×ＰＢＳＴで４回洗浄し、２００μＬ／ウェルで２%のＢＳＡを加え、３７℃で１．５時間ブロッキングした。

【０１８１】

ｃ．　３００μＬ／ウェルで１×ＰＢＳＴで４回洗浄し、勾配希釈した二重特異性抗体ＴＺＴ６、ＴＺＴ７及び陰性対照抗体（抗－ＫＬＨ　ｈＩｇＧ４）（初期濃度１０μｇ／ｍＬ、２．５倍勾配希釈した１２個の濃度点、１００μＬ／ウェル）を加え、３７℃で１時間インキュベートした。

【０１８２】

ｄ．　３００μＬ／ウェルで１×ＰＢＳＴで４回洗浄した。

【０１８３】

ｅ．　５０００倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）にカップリングするマウス抗ヒトＩｇＧ４　Ｆｃ抗体（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ、９２００－０５）を１００μＬ／ウェルで加え、３７℃で１時間インキュベートした。

【０１８４】

ｆ．　３００μＬ／ウェルで１×ＰＢＳＴで４回洗浄した。

【０１８５】

ｇ．　０．１ｍｇ／ｍＬのＴＭＢを１００μＬ／ウェルで加え、３７℃で１５分間インキュベートした後、２Ｍの塩酸溶液を１００μＬ／ウェルで加えて反応を停止した。

【０１８６】

ｈ．　　ププレートリーダーで４５０ｎｍ／６２０ｎｍの吸光度を測定し、Ｇｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍ７を用いてデータを分析した。

【０１８７】

３、試験結果

図２に示すように、本発明の二重特異性抗体ＴＺＴ６及びＴＺＴ７は、ヒトＣＤ３εと比較的強い結合を示し、EC_{50}がそれぞれ２１．４ｎｇ／ｍＬ及び８５．６３ｎｇ／ｍＬであった。

【０１８８】

実施例５：二重特異性抗体とＲａｊｉ細胞との結合

Ｒａｊｉ細胞（ヒトＢリンパ腫細胞、ＣＤ２０陽性）を、異なる濃度の二重特異性抗体ＴＺＴ７及びＴＺＴ６（初期濃度が１００μｇ／ｍＬ、３倍希釈し、合計１２個の濃度勾配）と共に４℃で３０分間インキュベートした後、洗浄し、４℃の条件で蛍光標識された二次抗体と共に暗所で３０分間インキュベートした。最後にフローサイトメーター（ＢＤ　ＣａｎｔｏＩＩ）により細胞を収集し、細胞表面に結合する蛍光抗体を検出した。ＦｌｏｗＪｏを用いて元データを分析してＭＦＩ値を取得すると共に、ＧｒａｐｈＰａｄにより抗体用量依存性の結合曲線（図３）をフィッティングし、EC_{50}を算出し、陽性対照及び陰性対照は、それぞれＲＥＧＮ１９７９（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）及び抗ＫＬＨ　ｈｕ－ＩｇＧ４抗体であった。

【０１８９】

図３に示すように、ＴＺＴ７、ＴＺＴ６及びＲＥＧＮ１９７９は、何れも高親和性でＲａｊｉ細胞表面のＣＤ２０に結合することができ、EC_{50}がそれぞれ０．５１５２μｇ／ｍＬ、３．６７３μｇ／ｍＬ及び３０．１１μｇ／ｍＬであり、ＴＺＴ７及びＴＺＴ６とＲａｊｉ細胞との結合能力が陽性対照ＲＥＧＮ１９７９よりも顕著に優れていた。

【０１９０】

実施例６：二重特異性抗体とＪｕｒｋａｔ細胞との結合

Ｊｕｒｋａｔ細胞（ヒトＴリンパ腫細胞、ＣＤ３陽性）を、異なる濃度の二重特異性抗体ＴＺＴ６及びＴＺＴ７（初期濃度が１００μｇ／ｍＬ、３倍希釈し、合計１２個の濃度勾配）と共に４℃で３０分間インキュベートした後、洗浄し、４℃の条件で蛍光標識された二次抗体と共に暗所で３０分間インキュベートした。最後にフローサイトメーター（ＢＤ　ＣａｎｔｏＩＩ）により細胞を収集し、細胞表面に結合する蛍光抗体を検出した。ＦｌｏｗＪｏを用いて元データを分析してＭＦＩ値を取得すると共に、ＧｒａｐｈＰａｄにより抗体用量依存性の結合曲線（図４）をフィッティングし、EC_{50}を算出し、陽性対照及び陰性対照は、それぞれＲＥＧＮ１９７９（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）及び抗ＫＬＨ　ｈｕ－ＩｇＧ４抗体であった。

【０１９１】

図４に示すように、ＲＥＧＮ１９７９、ＴＺＴ６及びＴＺＴ７は、何れもＪｕｒｋａｔ細胞表面のヒトＣＤ３に結合することができ、EC_{50}がそれぞれ４．６９８μｇ／ｍＬ、４．４４２μｇ／ｍＬ及び２６．５９μｇ／ｍＬであった。

【０１９２】

実施例７：二重特異性抗体と過剰発現カニクイザルＣＤ３ｅ細胞との結合

ＣＨＯ　Ｃｙｎｏ　ＣＤ３ｅ細胞（カニクイザルＣＤ３ｅをＣＨＯ細胞の表面で過剰発現する）を、異なる濃度の二重特異性抗体ＴＺＴ７及びＴＺＴ６（初期濃度が１００μｇ／ｍＬ、３倍希釈し、合計１２個の濃度勾配）と共に４℃で３０分間インキュベートした後、洗浄し、４℃の条件で蛍光標識された二次抗体と共に暗所で３０分間インキュベートした。最後にフローサイトメーター（ＢＤ　ＣａｎｔｏＩＩ）により細胞を収集し、細胞表面に結合する蛍光抗体を検出した。ＦｌｏｗＪｏを用いて元データを分析してＭＦＩ値を取得すると共に、ＧｒａｐｈＰａｄにより抗体用量依存性の結合曲線（図５）をフィッティングし、EC_{50}を算出し、陽性対照及び陰性対照は、それぞれＪＳＣＤ３（抗ＣＤ３抗体）及び抗ＫＬＨ　ｈｕ－ＩｇＧ４抗体であった。

【０１９３】

図５に示すように、二重特異性抗体ＴＺＴ７及びＴＺＴ６は、何れもカニクイザルＣＤ３ｅに結合することができる。

【０１９４】

実施例８：ルシフェラーゼレポーター遺伝子系における二重特異性抗体の活性検出

標的細胞Ｒａｊｉ（ヒトＢリンパ腫細胞、ＣＤ２０陽性）及びエフェクター細胞Ｊｕｒｋａｔ　ＮＦＡＴ（ｌｕｃ２Ｐ／ＮＦＡＴ－ＲＥを安定に発現する）を、それぞれ１ウェル当たり５×１０^{4}個の細胞及び１ウェル当たり１×１０^{5}個の細胞で９６ウェル平底白色プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ｃａｔ＃３９１７）に加えた。その後、二重特異性抗体ＴＺＴ７、ＴＺＴ６及びＲＥＧＮ１９７９（初期濃度が１μｇ／ｍＬ、３倍希釈し、合計１２個の濃度勾配）を、実験用緩衝液（ＲＰＭＩ　１６４０（１×）＋２％ＦＢＳ）を用いて細胞プレートに加え、３７℃のインキュベーターで４～６時間共インキュベートした。最後に、ＯＮＥ－Ｇｌｏルシフェラーゼ検出試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ）を細胞抗体混合系に加え、化学発光シグナルを多機能ププレートリーダー（ＴＥＣＡＮ　Ｍ１０００　ｐｒｏ）で検出した。ＧｒａｐｈＰａｄ　ｐｒｉｓｍソフトウェアにより４パラメータ回帰曲線をフィッティングし、ＥＣ$_{50}$値を算出した。

【０１９５】

図６に示すように、ＴＺＴ７、ＴＺＴ６及びＲＥＧＮ１９７９（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）は、エフェクター細胞Ｊｕｒｋａｔ　ＮＦＡＴ及び標的細胞Ｒａｊｉ細胞からなるルシフェラーゼレポーター遺伝子系において、Ｔ細胞を活性化する活性が強く、ＥＣ$_{50}$がそれぞれ０．２０８７ｎｇ／ｍＬ、０．６０５７ｎｇ／ｍＬ及び３．６８８ｎｇ／ｍＬであり、ＴＺＴ７及びＴＺＴ６は、ＲＥＧＮ１９７９よりもＴ細胞活性化活性が顕著に優れていた。

【０１９６】

実施例９：Ｔリンパ球に対する二重特異性抗体の活性化の研究

抗ＣＤ３／ＣＤ２０二重特異性抗体は、末梢血単球におけるＴリンパ球の活性化を効果的に促進することができ、一般的に、細胞表面マーカーであるＣＤ６９の発現アップレギュレートは、Ｔ細胞活性化の初期標識であり、細胞表面マーカーであるＣＤ２５の発現アップレギュレートは、Ｔ細胞活性化の後期標識であり、本実験は、ＣＤ２５及びＣＤ６９の二重陽性集団の増加した割合によって本研究におけるＴ細胞に対する抗ＣＤ３／ＣＤ２０二重特異性抗体の活性化作用を評価した。

【０１９７】

ヒト総Ｔ細胞を、ヒト総Ｔ細胞精製試薬キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ、Ｃａｔ＃１３０－０９６－５３５）を用いて市販のＰＢＭＣ（Ａｌｌｃｅｌｌｓ、Ｃａｔ＃ＰＢ００４Ｆ－Ｃ）から単離して精製し、次いで、精製したヒト総Ｔ細胞（１ウェルあたり１×１０^{5}個の細胞）及びＲａｊｉ細胞（１ウェルあたり２×１０^{4}個の細胞）を、勾配希釈したＴＺＴ７及びＴＺＴ６又は対照試料（初期濃度が１０μｇ／ｍＬ、５倍希釈し、合計１２個の濃度勾配）と共に、９６ウェルプレートにおいて３７℃で２４時間共インキュベートした。最後に細胞を収集し、ＡＰＣ抗ヒトＣＤ８ａ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、Ｃａｔ＃３０１０４９）、ＰＥ抗ヒトＣＤ２５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、Ｃａｔ＃３０２６０６）、ＢＶ４２１抗ヒトＣＤ６９（ＢＤ、Ｃａｔ＃５６２８８４）で染色した後、フローサイトメーター（ＢＤ、ＣａｎｔｏＩＩ）でマシンにより検出を行った。ＦｌｏｗＪｏソフトウェアを用いてＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞上のＣＤ２５$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$の二重陽性細胞集団の割合を導出し、更にＧｒａｐｈＰａｄ　ｐｒｉｓｍソフトウェアにより４パラメータ回帰曲線をフィッティングし、ＥＣ$_{50}$値を算出した。

【０１９８】

図７に示すように、本発明の抗ＣＤ３／ＣＤ２０二重特異性抗体ＴＺＴ７、ＴＺＴ６及び陽性対照ＲＥＧＮ１９７９（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）は、何れもＣＤ８Ｔリンパ球におけるＣＤ２５$^{+}$及びＣＤ６９$^{+}$の二重陽性細胞集団の割合の増加を効果的に促進することができ、Ｔ細胞活性化の促進を示し、ＥＣ$_{50}$がそれぞれ０．１４７６ｎｇ／ｍＬ、０．９１９０ｎｇ／ｍＬ、及び５．６３２ｎｇ／ｍＬであっ

た。ＴＺＴ７及びＴＺＴ６は、ＲＥＧＮ１９７９よりもＴ細胞活性化活性が顕著に優れていた。

【０１９９】

実施例１０：二重特異性抗体によるＢリンパ腫細胞に対するＴ細胞の殺傷活性を促進するための研究

フローサイトメトリーを用いて、本発明における抗ＣＤ３／ＣＤ２０二重特異性抗体がＢリンパ腫細胞（Ｒａｊｉ細胞）に対するＴ細胞の殺傷活性を促進する能力を検出した。

【０２００】

まず、ヒト総Ｔ細胞を、Ｈｕｍａｎ ｐａｎ Ｔ ｃｅｌｌ ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ｋｉｔ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ、Ｃａｔ＃１３０－０９６－５３５）を用いて市販のＰＢＭＣ（Ａｌｌｃｅｌｌｓ、Ｃａｔ＃ＰＢ００４Ｆ－Ｃ）から単離して精製し、次いで、Ｒａｊｉ細胞をＣＦＳＥ細胞増殖試薬キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｔ＃Ｃ３４５５４）で標識し、精製したヒト総Ｔ細胞（１ウェルあたり1×10^5個の細胞）及びＣＦＳＥで標識したＲａｊｉ細胞（１ウェルあたり2×10^4個の細胞）を、勾配希釈したＴＺＴ７、ＴＺＴ６又は対照試料（初期濃度が１０μｇ／ｍＬ、６倍希釈し、合計１０個の濃度勾配）と共に、９６ウェルプレートにおいて３７℃で７２時間共インキュベートした。最後に細胞を収集し、７－ＡＡＤ（ＢＤ、Ｃａｔ＃５５９９２５）で染色した後、フローサイトメーター（ＢＤ、Ｃａｎｔｏ ＩＩ）によって細胞を収集した。ＦｌｏｗＪｏソフトウェアを用いて死滅されたＲａｊｉ細胞集団の割合、即ち$CFSE^+7-AAD^+$（Ｐｅｒｃｐ－ｃｙ５．５チャネル）二重陽性集団の割合を分析し、更にＧｒａｐｈ Ｐａｄ ｐｒｉｓｍソフトウェアにより４パラメータ回帰曲線をフィッティングし、EC_{50}値を算出した。

【０２０１】

図８に示すように、本発明の抗ＣＤ３／ＣＤ２０二重特異性抗体ＴＺＴ７、ＴＺＴ６及びＲＥＧＮ１９７９（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）は、何れもＴ細胞によるＢリンパ腫細胞（即ち、Ｒａｊｉ細胞）の殺傷を効果的に促進することができ、EC_{50}がそれぞれ０．９８６９ｎｇ／ｍＬ、４１．４０ｎｇ／ｍＬ及び６２．９５ｎｇ／ｍＬであり、ＴＺＴ７の殺傷活性がＲＥＧＮ１９７９よりも顕著に優れていた。

【０２０２】

実施例１１：カニクイザルの単回投与ＰＫ研究

１、試験目的

カニクイザルの単回投与のための本発明の二重特異性抗体のＰＫ研究。

【０２０３】

２、試験過程

ａ．　１．０μｇ／ｍＬ濃度の組換えヒトＣＤ３ε（Ｎｏｖｏｐｒｏｔｅｉｎ、Ｃ５７８）を抗原として１００μＬ／ウェルで９６ウェルプレートをコーティングし、３７℃で１．５時間インキュベートした。

【０２０４】

ｂ．　３００μＬ／ウェルで１×ＰＢＳＴで４回洗浄し、２００μＬ／ウェルで２％のＢＳＡを加え、３７℃で１．５時間ブロッキングした。

【０２０５】

ｃ．　ブランクのカニクイザル血清を用いて範囲が８μｇ／ｍＬ～１２５ｎｇ／ｍＬのＴＺＴ７検量線試料を調製し、ブランクのカニクイザル血清を用いて範囲が４μｇ／ｍＬ～６２．５ｎｇ／ｍＬのＴＺＴ６検量線試料を調製し、ブランクのカニクイザル血清を用いて検体を検量線の範囲に希釈した。その後、検量線試料及び検体を２％のＢＳＡで１０倍に一括希釈した。上記で調製した検体を１００μＬ／ウェルで加え、３７℃で１時間インキュベートし、プレートを洗浄した。

【０２０６】

ｄ．　３００μＬ／ウェルで１×ＰＢＳＴで４回洗浄した。

【０２０７】

ｅ．　　５０００倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）にカップリングするマウス抗ヒトＩｇＧ４　Ｆｃ抗体（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ、９２００－０５）を１００μＬ／ウェルで加え、３７℃で１時間インキュベートした。

【０２０８】

ｆ．　　３００μＬ／ウェルで１×ＰＢＳＴで４回洗浄した。

【０２０９】

ｇ．　　０．１ｍｇ／ｍＬのＴＭＢを１００μＬ／ウェルで加え、３７℃で５～７分間インキュベートした後、２Ｍの塩酸溶液を１００μＬ／ウェルで加えて反応を停止した。

【０２１０】

ｈ．　　ププレートリーダーで４５０ｎｍ／６２０ｎｍの吸光度を測定し、ＳｏｆｔＭａｘ　Ｐｒｏ５．４．１の４パラメータモデルを用いてデータを分析した。

【０２１１】

３、試験結果

表４に示すように、本発明の二重特異性抗体ＴＺＴ７カニクイザルは、体内投与量が１ｍｇ／ｋｇである場合、半減期が１９．１時間であり、C_{max}が２４．１ｍｇ／Ｌであり、投与量が１０ｍｇ／ｋｇである場合、半減期が１３８．３時間であり、C_{max}が３４８．２ｍｇ／Ｌであった。本発明の二重特異性抗体ＴＺＴ６カニクイザルは、体内投与量が１ｍｇ／ｋｇである場合、半減期が１６４．２時間であり、C_{max}が２４．１ｍｇ／Ｌであり、投与量が１０ｍｇ／ｋｇである場合、半減期が１６８．８時間であり、C_{max}が２４４．９ｍｇ／Ｌであった。

【０２１２】

【表４】

表４　カニクイザルの単回投与ＰＫ結果

PKパラメータ	TZT7		TZT6	
	投与量 1mg／kg Average ±SD	投与量 10mg／kg Average±SD	投与量 1mg／kg Average ±SD	投与量 10mg／kg Average±SD
$AUC_{(0-t)}$／mg／L＊h	402．2±17．5	8122．2±1019．3	1240．7±11．9	17250．2±6826．7
$t_{1/2z}$／h	19．1±2．0	138．3±21．0	164．2±54．0	168．8±87．4
T_{max}／ h	0．5±0．0	1．25±1．1	0．5±0．0	0．5±0．0
C_{max}／mg／L	24．1±2．5	348．2±8．1	24．1±1．1	244．9±75．7

【０２１３】

注記：ＡＵＣ（０－ｔ）：薬剤濃度－時間曲線下面積、$t_{1/2}$：末端消失半減期、T_{max}：ピーク到達時間、C_{max}：薬剤ピーク濃度。

【０２１４】

実施例１２：Ｂ１６　ＯＶＡ　ｈｕＣＤ２０腫瘍の成長に対する二重特異性抗体の阻害作用

１、試験目的

マウス黒色腫Ｂ１６　ＯＶＡ　ｈｕＣＤ２０皮下移植腫瘍モデルにおける本発明のＴＺＴ６及びＴＺＴ７の抗腫瘍作用を評価した。

【０２１５】

２、試験過程
６～８週齢の雌ｈＣＤ３ｅヒト化マウス（Ｂｉｏｃｙｔｏｇｅｎ　ＪｉａｎｇＳｕ　Ｃｏ．，Ｌｔｄから購入）に、２．５×１０^{5}個のＢ１６　ＯＶＡ　ｈｕＣＤ２０　１Ｆ１１細胞（ヒトＣＤ２０遺伝子を形質導入）を右側背部に皮下接種した。平均腫瘍体積が約５２ｍｍ^{3}である場合、適切な動物を選択し、腫瘍体積に応じて群あたり６匹の動物で３群にランダムに分けた。それぞれ
溶媒対照群、
－Ｇ１生理食塩水群、
治療群、
－Ｇ２　ＴＺＴ６（１０ｍｇ／ｋｇ）群、及び
－Ｇ３　ＴＺＴ７（１０ｍｇ／ｋｇ）群である。

【０２１６】
腹腔内注射によって週に２回投与し、連続的に２週間投与し、最後の投与から４日間後、実験を終了した。腫瘍の体積及び体重を週に２回測定し、マウスの体重及び腫瘍の体積を記録した。実験終了後、マウスを安楽死させ、腫瘍阻害率ＴＧＩ（％）＝［１－（Ｔｉ－Ｔ０）／（Ｖｉ－Ｖ０）］×１００％を算出した。（Ｔｉ：投与ｉ日目の治療群の腫瘍体積平均値であり、Ｔ０：投与０日目の治療群の腫瘍体積平均値であり、Ｖｉ：投与ｉ日目の溶媒対照群の腫瘍体積平均値であり、Ｖ０：投与０日目の溶媒対照群の腫瘍体積平均値である）。

【０２１７】
図９に示すように、投与後１４日目に、生理食塩水対照群は、平均腫瘍体積が２１７０ｍｍ^{3}であり、ＴＺＴ６群は、平均腫瘍体積が１４５５ｍｍ^{3}であり、生理食塩水対照群に比べて腫瘍阻害率が３３．７％であった。ＴＺＴ７群は、平均腫瘍体積が３７２ｍｍ^{3}であり、生理食塩水対照群に比べて腫瘍阻害率が８４．９％であり、腫瘍体積の増加を顕著に阻害した。結果により、ｈＣＤ３ｅヒト化マウス移植Ｂ１６　ＯＶＡ　ｈｕＣＤ２０　１Ｆ１１モデルにおいて、ＴＺＴ６及びＴＺＴ７は、１０ｍｇ／ｋｇの用量レベルで何れも腫瘍阻害作用を示すことを示した。

【０２１８】
実施例１３：Ｂ１６　ＯＶＡ　ｈｕＣＤ２０腫瘍成長に対するＴＺＴ７の阻害作用
１、試験目的
マウス黒色腫Ｂ１６　ＯＶＡ　ｈｕＣＤ２０皮下移植腫瘍モデルにおける本発明のＴＺＴ７の抗腫瘍作用を評価した。

【０２１９】
２、試験過程
６～８週齢の雌ｈＣＤ３ｅヒト化マウス（Ｂｉｏｃｙｔｏｇｅｎ　ＪｉａｎｇＳｕ　Ｃｏ．，Ｌｔｄから購入）に、２．５×１０^{5}個のＢ１６　ＯＶＡ　ｈｕＣＤ２０　１Ｆ１１細胞（ヒトＣＤ２０遺伝子を形質導入）を右側背部に皮下接種した。平均腫瘍体積が約８８ｍｍ^{3}である場合、適切な動物を選択し、腫瘍体積に応じて群あたり６匹の動物で３群にランダムに分けた。それぞれ
溶媒対照群、
－Ｇ１生理食塩水群、
治療群、
－Ｇ２　ＴＺＴ７（１０ｍｇ／ｋｇ）群、及び
－Ｇ３　ＲＥＮＧ１９７９（１０ｍｇ／ｋｇ）群である。

【０２２０】
腹腔内注射によって週に２回投与し、連続的に２週間投与し、最後の投与から４日間後、実験を終了した。腫瘍の体積及び体重を週に２回測定し、マウスの体重及び腫瘍の体積を記録した。実験終了後、マウスを安楽死させ、腫瘍阻害率ＴＧＩを算出した。ＴＧＩ（％）＝［１－（Ｔｉ－Ｔ０）／（Ｖｉ－Ｖ０）］×１００％。（Ｔｉ：投与ｉ日目の治療群の腫瘍体積平均値であり、Ｔ０：投与０日目の治療群の腫瘍体積平均値であり、Ｖｉ：

投与ｉ日目の溶媒対照群の腫瘍体積平均値であり、Ｖ０：投与０日目の溶媒対照群の腫瘍体積平均値である）。

【０２２１】

図１０に示すように、投与後１８日目に、生理食塩水対照群は、平均腫瘍体積が２５１７ｍｍ^{3}であり、ＲＥＮＧ１９７９（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）群は、平均腫瘍体積が２６４６ｍｍ^{3}であり、生理食塩水対照群に比べて腫瘍阻害率が－５．３％であり、腫瘍阻害作用は認められなかった。ＴＺＴ７群は、平均腫瘍体積が３７１ｍｍ^{3}であり、生理食塩水対照群に比べて腫瘍阻害率が８８．３％であり、腫瘍体積の増加を顕著に阻害した。結果により、ＴＺＴ７は、１０ｍｇ／ｋｇの用量レベルでｈＣＤ３ｅヒト化マウス移植Ｂ１６ ＯＶＡ ｈｕＣＤ２０ １Ｆ１１腫瘍の成長を顕著に阻害し得ることを示した。

【０２２２】

実施例１４：ヒトリンパ腫Ｒａｊｉ Ｍｉｘｅｎｏモデルに対するＴＺＴ６及びＴＺＴ７の阻害作用

１、試験目的

ヒトリンパ腫Ｒａｊｉ Ｍｉｘｅｎｏモデルにおける本発明のＴＺＴ６及びＴＺＴ７の抗腫瘍作用を評価した。

【０２２３】

２、試験過程

６～８週齢の雌ＮＤＧマウス（Ｂｉｏｃｙｔｏｇｅｎ ＪｉａｎｇＳｕ Ｃｏ．，Ｌｔｄから購入）に、予め混合した２．５×１０^{6}個のＲａｊｉ細胞及び５×１０^{6}個のＰＢＭＣ（Ａｌｌｃｅｌｌｓから購入）の懸濁液（０．２ｍＬ／匹）を右側背部に皮下接種し、皮下移植腫瘍モデルを確立した。平均腫瘍体積が約１０８ｍｍ^{3}である場合、適切な動物を選択し、腫瘍体積に応じて群あたり６匹の動物で５群にランダムに分け、それぞれ

溶媒対照群、

－Ｇ１生理食塩水群、

治療群、

－Ｇ２ ＴＺＴ６（１ｍｇ／ｋｇ）群、

－Ｇ３ ＴＺＴ６（３ｍｇ／ｋｇ）群、

－Ｇ４ ＴＺＴ７（１ｍｇ／ｋｇ）群、

－Ｇ５ ＴＺＴ７（３ｍｇ／ｋｇ）群であり、

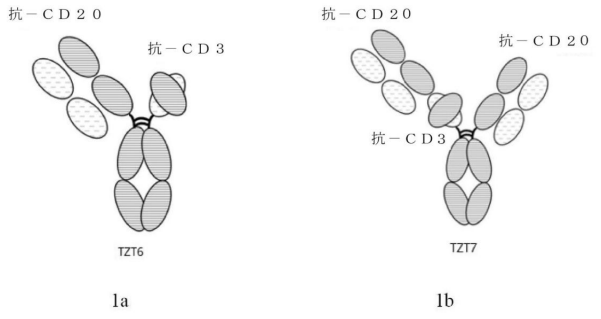
腹腔内注射し、単回投与し、１８日投与後に実験を終了した。腫瘍の体積及び体重を週に２回測定し、マウスの体重及び腫瘍の体積を記録した。実験終了後、マウスを安楽死させ、腫瘍阻害率ＴＧＩを算出した。ＴＧＩ（％）＝［１－（Ｔｉ－Ｔ０）／（Ｖｉ－Ｖ０）］×１００％。（Ｔｉ：投与ｉ日目の治療群の腫瘍体積平均値であり、Ｔ０：投与０日目の治療群の腫瘍体積平均値であり、Ｖｉ：投与ｉ日目の溶媒対照群の腫瘍体積平均値であり、Ｖ０：投与０日目の溶媒対照群の腫瘍体積平均値である）。

【０２２４】

図１１に示すように、投与開始後１８日目に、生理食塩水対照群は、平均腫瘍体積が１６１０ｍｍ^{3}であり、ＴＺＴ６は、１ｍｇ／ｋｇ及び３ｍｇ／ｋｇの用量レベで平均腫瘍体積がそれぞれ７２３ｍｍ^{3}及び２３３ｍｍ^{3}であり、腫瘍阻害率が生理食塩水対照群と比べてそれぞれ５８．７％及び９１．５％であり、腫瘍体積の増加を顕著に阻害した。ＴＺＴ７は、１ｍｇ／ｋｇ及び３ｍｇ／ｋｇの用量レベルで平均腫瘍体積がそれぞれ２６４ｍｍ^{3}及び９９ｍｍ^{3}であり、腫瘍阻害率がそれぞれ８９．６％及び１００．６％であり、腫瘍体積の増加を顕著に阻害した。結果により、ＴＺＴ６及びＴＺＴ７は、１ｍｇ／ｋｇ及び３ｍｇ／ｋｇの用量レベルでヒトリンパ腫Ｒａｊｉ細胞の皮下移植腫瘍の成長を顕著に阻害し得ることを示した。

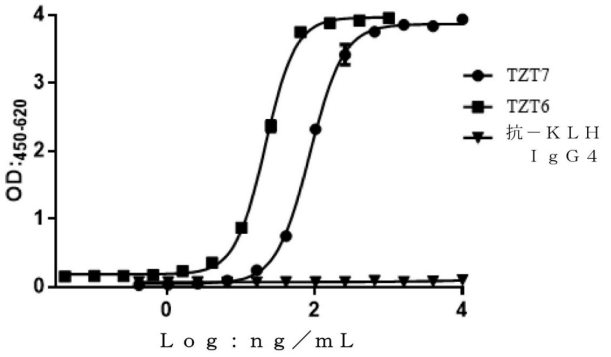
【図面】

【図１】



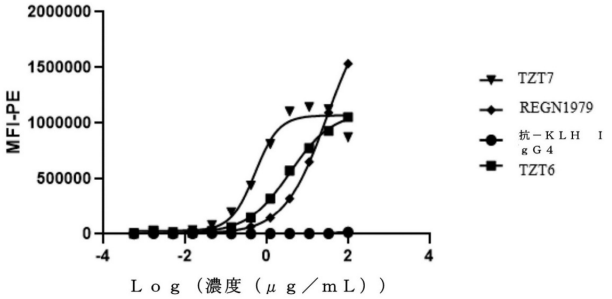
1a 1b

【図２】



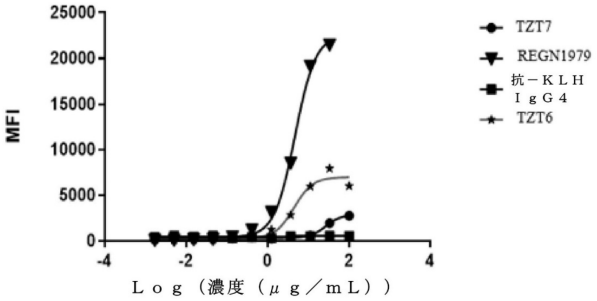
	TZT7	TZT6	抗－ＫＬＨ ＩｇＧ
EC50	85.63	21.4	~ 8657160622

【図３】



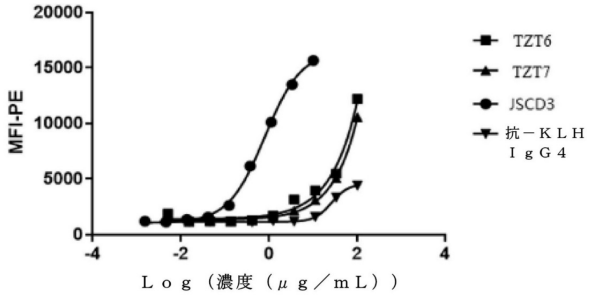
	TZT7	TZT6	REGN1979	抗－ＫＬＨ ＩｇＧ
EC50	0.5152	3.673	30.11	~ 51.97

【図４】

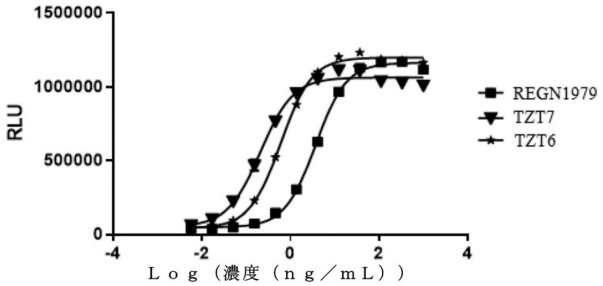


	TZT7	REGN1979	TZT6	抗－ＫＬＨ ＩｇＧ
EC50	26.59	4.698	4.442	NA

【図５】

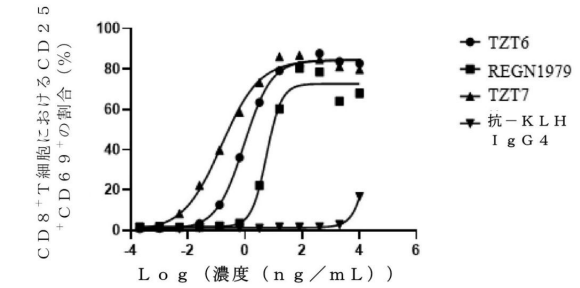


【図６】



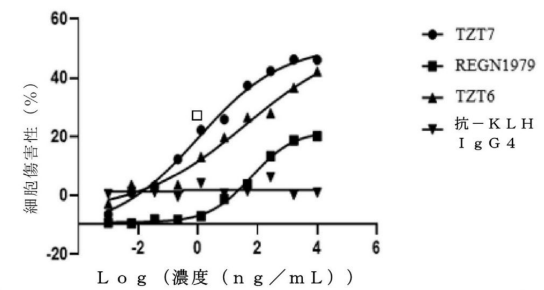
	REGN-1979	TZT7	TZT6
EC50	3.688	0.2087	0.6057

【図７】



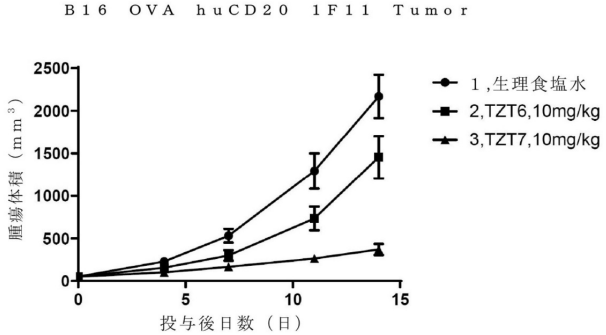
	TZT6	REGN1979	TZT7	抗－ＫＬＨ－ＩｇＧ４
EC50	0.9190	5.632	0.1476	~476441

【図８】

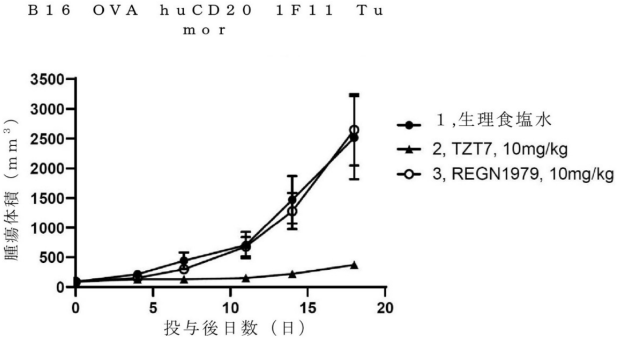


	TZT7	REGN1979	TZT6	抗－ＫＬＨ－ＩｇＧ４
EC50	0.9869	62.95	41.40	NA

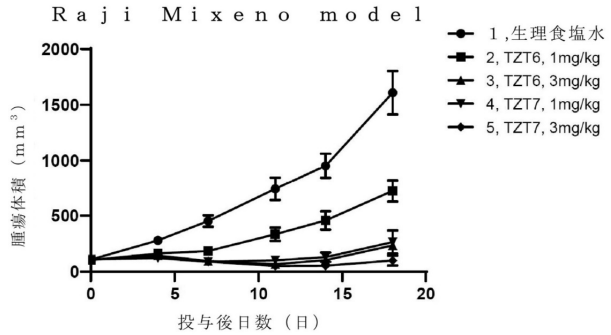
【図９】



【図１０】



【図１１】



【配列表】

<u>２０２５０８３１７０００００１.ｘｍｌ</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/072510

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/46(2006.01)i;C12N15/13(2006.01)i;A61K39/395(2006.01)i;A61K38/19(2006.01)i;A61P35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07K, C12N, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNTXT, DWPI, ENTXT, ENTXTC, VEN, WPABS, WPABSC, CNKI, Web of Science, Pubmed: CD3, CD20, antibody, bioantibody; 中国专利生物序列检索系统, STN, Genbank, EMBL: SEQ ID NO: 1-23

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 110603266 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 20 December 2019 (2019-12-20) entire document, in particular claims 1-63	1-20, 22
X	CN 110088135 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 02 August 2019 (2019-08-02) entire document, in particular claims 1-34	1-20, 22
A	CN 111138545 A (ANYUAN MEDICINE TECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 12 May 2020 (2020-05-12) entire document	1-20, 22
A	CN 104640881 A (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 20 May 2015 (2015-05-20) entire document	1-20, 22
A	CN 108059680 A (BEIJING ORIENTAL 100 TAI BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 22 May 2018 (2018-05-22) entire document	1-20, 22
A	CN 110041429 A (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 23 July 2019 (2019-07-23) entire document	1-20, 22

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 April 2023	**25 November 2024**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088**	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/072510

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 112955471 A (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.; SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 11 June 2021 (2021-06-11) entire document	1-20, 22
A	CN 112996807 A (ANYUAN MEDICINE TECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 18 June 2021 (2021-06-18) entire document	1-20, 22
A	TW 202030206 A (WUXI BIOLOGICS SHANGHAI CO LTD) 16 August 2020 (2020-08-16) entire document	1-20, 22
A	于蕊 李世崇 吴本传 刘红 叶玲玲 刘兴茂 王启伟 陈昭烈 (YU, Rui; LI, Shichong; WU, Benchuan; LIU, Hong; YE, Lingling; LIU, Xingmao; WANG, Qiwei; CHEN, Zhaolie). "抗CD3/抗CD20双特异性单链抗体介导的B淋巴瘤细胞体外裂解作用 (In vitro Cytolysis of B-lymphoma Cells Mediated by an Anti-CD3/Anti-CD20 Bispecific Single-chain Antibody)" *Chinese Journal of Biotechnology*, Vol. 22, No. 3, 30 May 2006 (2006-05-30), 384-390 entire document	1-20, 22
A	熊冬生, 许元富, 杨纯正, 彭晖, 邵晓枫, 赖增祖, 范冬梅, 杨铭, 朱祯平 (XIONG, Dongsheng; XU, Yuanfu; YANG, Chunzheng; PENG, Hui; SHAO, Xiaofeng; LAI, Zengzu; FAN, Dongmei; YANG, Ming; ZHU, Zhenping). "微型双功能抗体抗CD3/抗CD20的构建和表达 (Study on the Construction and Expression of anti-CD3/anti-CD20 Diabody)" *Chinese Journal of Immunology*, Vol. 17, No. (7), 25 July 2001 (2001-07-25), 339-347 entire document	1-20, 22

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/072510

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/072510

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **vol. 21**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

PCT Rule 39.1(iv) – a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/072510

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 110603266 A	20 December 2019	US 2020172627 A1	04 June 2020
		CA 3059010 A1	06 December 2018
		MX 2019014274 A	23 January 2020
		WO 2018220099 A1	06 December 2018
		TW 201902512 A	16 January 2019
		EP 3630829 A1	08 April 2020
		AU 2018276419 A1	17 October 2019
		BR 112019022558 A2	19 May 2020
		JP 2020521791 A	27 July 2020
		KR 20200014304 A	10 February 2020
CN 110088135 A	02 August 2019	JP 2020504723 A	13 February 2020
		IL 267406 A	29 August 2019
		BR 112019007267 A2	09 July 2019
		CA 3039446 A1	28 June 2018
		KR 20190093588 A	09 August 2019
		ES 2847973 T3	04 August 2021
		MX 2019006954 A	01 August 2019
		EP 3559034 A1	30 October 2019
		EP 3559034 B1	02 December 2020
		PL 3559034 T3	19 April 2021
		TW 201834684 A	01 October 2018
		TWI 773712 B	11 August 2022
		US 2020325238 A1	15 October 2020
		AU 2017384126 A1	02 May 2019
		WO 2018114748 A1	28 June 2018
CN 111138545 A	12 May 2020	EP 3875485 A1	08 September 2021
		EP 3875485 A4	12 October 2022
		EP 3875479 A1	08 September 2021
		EP 3875479 A4	24 August 2022
		AU 2019370758 A1	10 June 2021
		US 2021371526 A1	02 December 2021
		US 2022002431 A1	06 January 2022
		WO 2020088608 A1	07 May 2020
		KR 20210087472 A	12 July 2021
		WO 2020088164 A1	07 May 2020
		CA 3118238 A1	07 May 2020
		KR 20210089697 A	16 July 2021
		EP 3875489 A1	08 September 2021
		EP 3875489 A4	21 December 2022
		AU 2019370339 A1	10 June 2021
		WO 2020088403 A1	07 May 2020
		CA 3118397 A1	07 May 2020
		EP 3889174 A1	06 October 2021
		US 2022002407 A1	06 January 2022
		WO 2020088605 A1	07 May 2020
		US 2023073411 A1	09 March 2023
		CO 2021006970 A2	30 July 2021
		PE 20211867 A1	21 September 2021
		JP 2022512865 A	07 February 2022
		WO 2020088437 A1	07 May 2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/072510

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		JP 2022512997 A	07 February 2022
		EP 3889179 A1	06 October 2021
		EP 3889179 A4	12 October 2022
		CL 2021001143 A1	22 October 2021
CN 104640881 A	20 May 2015	TW 201945398 A	01 December 2019
		TWI 697502 B	01 July 2020
		PH 12019502070 A1	18 January 2021
		US 2022144947 A1	12 May 2022
		AU 2020239677 A1	15 October 2020
		NZ 706232 A	30 November 2018
		TW 201418282 A	16 May 2014
		TWI 618716 B	21 March 2018
		NZ 742078 A	31 January 2020
		JOP 20200237 A1	16 June 2017
		AU 2013318059 A1	09 April 2015
		AU 2013318059 B2	18 October 2018
		AU 2013318059 C1	15 October 2020
		CL 2017001729 A1	16 March 2018
		MY 179577 A	11 November 2020
		JO 3716 B1	31 January 2021
		SG 10201704833 WA	28 July 2017
		KR 20150046789 A	30 April 2015
		KR 102163136 B1	12 October 2020
		US 2014088295 A1	27 March 2014
		US 9657102 B2	23 May 2017
		US 2017320948 A1	09 November 2017
		US 11072656 B2	27 July 2021
		BR 112015005380 A2	08 August 2017
		BR 112015005380 B1	29 November 2022
		IL 237301 A0	30 April 2015
		IL 237301 B	31 August 2020
		AR 092612 A1	29 April 2015
		CL 2020003179 A1	30 April 2021
		PH 12015500328 A1	30 March 2015
		EA 201590613 A1	31 August 2015
		EA 033400 B1	31 October 2019
		JP 2021130701 A	09 September 2021
		SG 10202111095 XA	29 November 2021
		HK 1212996 A1	24 June 2016
		AU 2018232926 A1	04 October 2018
		AU 2018232926 B2	25 June 2020
		EP 3778641 A1	17 February 2021
		CL 2015000713 A1	10 July 2015
		JP 2021020961 A	18 February 2021
		JP 6865324 B2	28 April 2021
		KR 20200116548 A	12 October 2020
		KR 102470709 B1	28 November 2022
		SG 11201501269 XA	30 March 2015
		JP 2015535828 A	17 December 2015
		JP 6923292 B2	18 August 2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/072510

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				WO	2014047231	A1	27 March 2014
				TW	201809007	A	16 March 2018
				TWI	688573	B	21 March 2020
				CA	3135724	A1	27 March 2014
				US	2018215823	A1	02 August 2018
				US	11155621	B2	26 October 2021
				JOP	20200236	A1	16 June 2017
				JP	2019214591	A	19 December 2019
				MX	2015003206	A	14 July 2015
				CO	7400860	A2	30 September 2015
				EP	2897981	A1	29 July 2015
				TW	202039579	A	01 November 2020
				MX	2020004119	A	10 August 2020
				CA	2885156	A1	27 March 2014
				CA	2885156	C	07 December 2021
				IL	268369	A	26 September 2019
				IL	268369	B	28 February 2021
				UY	35042	A	30 April 2014
CN	108059680	A	22 May 2018		None		
CN	110041429	A	23 July 2019		None		
CN	112955471	A	11 June 2021	ZA	202104518	B	25 January 2023
				EP	3892639	A1	13 October 2021
				EP	3892639	A4	24 August 2022
				JP	2022510322	A	26 January 2022
				CA	3121565	A1	11 June 2020
				BR	112021010026	A2	17 August 2021
				US	2022242953	A1	04 August 2022
				AU	2019394241	A1	03 June 2021
				TW	202021987	A	16 June 2020
				KR	20210100654	A	17 August 2021
				WO	2020114478	A1	11 June 2020
CN	112996807	A	18 June 2021		None		
TW	202030206	A	16 August 2020	KR	20210120031	A	06 October 2021
				EP	3917969	A1	08 December 2021
				EP	3917969	A4	01 February 2023
				WO	2020156405	A1	06 August 2020
				TWI	754211	B	01 February 2022
				JP	2022518530	A	15 March 2022
				US	2022162312	A1	26 May 2022

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/072510

A. 主题的分类

C07K16/46(2006.01)i;C12N15/13(2006.01)i;A61K39/395(2006.01)i;A61K38/19(2006.01)i;A61P35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC：C07K，C12N，A61K，A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNTXT,DWPI,ENTXT,ENTXTC,VEN,WPABS,WPABSC,CNKI,Web of Science,Pubmed:CD3,CD20,antibody,bioantibody；中国专利生物序列检索系统,STN,Genbank,EMBL:SEQ ID NO：1-23

C. 相关文件

类型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 110603266 A (豪夫迈·罗氏有限公司) 2019年12月20日 (2019-12-20) 全文，尤其是权利要求1-63	1-20，22
X	CN 110088135 A (豪夫迈·罗氏有限公司) 2019年8月2日 (2019-08-02) 全文，尤其是权利要求1-34	1-20，22
A	CN 111138545 A (安源医药科技（上海）有限公司) 2020年5月12日 (2020-05-12) 全文	1-20，22
A	CN 104640881 A (瑞泽恩制药公司) 2015年5月20日 (2015-05-20) 全文	1-20，22
A	CN 108059680 A (北京东方百泰生物科技有限公司) 2018年5月22日 (2018-05-22) 全文	1-20，22
A	CN 110041429 A (瑞泽恩制药公司) 2019年7月23日 (2019-07-23) 全文	1-20，22
A	CN 112955471 A (江苏恒瑞医药股份有限公司 上海恒瑞医药有限公司) 2021年6月11日 (2021-06-11) 全文	1-20，22

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。　☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：
"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件
"D" 申请人在国际申请中引证的文件
"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利
"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）
"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件
"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件
"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性
"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2023年4月14日	2024年11月25日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	受权官员 李颖 电话号码 (+86) 010-62412262

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/072510

C. 相关文件

类型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 112996807 A (安源医药科技（上海）有限公司) 2021年6月18日 (2021 - 06 - 18) 全文	1-20，22
A	TW 202030206 A (WUXI BIOLOGICS SHANGHAI CO LTD) 2020年8月16日 (2020 - 08 - 16) 全文	1-20，22
A	于蕊 李世崇 吴本传 刘红 叶玲玲 刘兴茂 王启伟 陈昭烈. "抗CD3/抗CD20双特异性单链抗体介导的B淋巴瘤细胞体外裂解作用" 生物工程学报, 第22卷，第3期，2006年5月30日 (2006 - 05 - 30)，384-390 全文	1-20，22
A	熊冬生,许元富,杨纯正,彭晖,邵晓枫,赖增祖,范冬梅,杨铭,朱祯平. "微型双功能抗体抗CD3/抗CD20的构建和表达" 中国免疫学杂志, 第17卷，第7期，2001年7月25日 (2001 - 07 - 25)，339-347 全文	1-20，22

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/072510

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的:
b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/072510

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项）

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☑ 权利要求：21
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
PCT细则39.1（iv）——处置人体或者动物体的外科手术方法或治疗方法。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/072510

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	110603266	A	2019年12月20日	US	2020172627	A1	2020年6月4日
				CA	3059010	A1	2018年12月6日
				MX	2019014274	A	2020年1月23日
				WO	2018220099	A1	2018年12月6日
				TW	201902512	A	2019年1月16日
				EP	3630829	A1	2020年4月8日
				AU	2018276419	A1	2019年10月17日
				BR	112019022558	A2	2020年5月19日
				JP	2020521791	A	2020年7月27日
				KR	20200014304	A	2020年2月10日
CN	110088135	A	2019年8月2日	JP	2020504723	A	2020年2月13日
				IL	267406	A	2019年8月29日
				BR	112019007267	A2	2019年7月9日
				CA	3039446	A1	2018年6月28日
				KR	20190093588	A	2019年8月9日
				ES	2847973	T3	2021年8月4日
				MX	2019006954	A	2019年8月1日
				EP	3559034	A1	2019年10月30日
				EP	3559034	B1	2020年12月2日
				PL	3559034	T3	2021年4月19日
				TW	201834684	A	2018年10月1日
				TWI	773712	B	2022年8月11日
				US	2020325238	A1	2020年10月15日
				AU	2017384126	A1	2019年5月2日
				WO	2018114748	A1	2018年6月28日
CN	111138545	A	2020年5月12日	EP	3875485	A1	2021年9月8日
				EP	3875485	A4	2022年10月12日
				EP	3875479	A1	2021年9月8日
				EP	3875479	A4	2022年8月24日
				AU	2019370758	A1	2021年6月10日
				US	2021371526	A1	2021年12月2日
				US	2022002431	A1	2022年1月6日
				WO	2020088608	A1	2020年5月7日
				KR	20210087472	A	2021年7月12日
				WO	2020088164	A1	2020年5月7日
				CA	3118238	A1	2020年5月7日
				KR	20210089697	A	2021年7月16日
				EP	3875489	A1	2021年9月8日
				EP	3875489	A4	2022年12月21日
				AU	2019370339	A1	2021年6月10日
				WO	2020088403	A1	2020年5月7日
				CA	3118397	A1	2020年5月7日
				EP	3889174	A1	2021年10月6日
				US	2022002407	A1	2022年1月6日
				WO	2020088605	A1	2020年5月7日
				US	2023073411	A1	2023年3月9日
				CO	2021006970	A2	2021年7月30日
				PE	20211867	A1	2021年9月21日
				JP	2022512865	A	2022年2月7日
				WO	2020088437	A1	2020年5月7日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/072510

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				JP	2022512997	A	2022年2月7日
				EP	3889179	A1	2021年10月6日
				EP	3889179	A4	2022年10月12日
				CL	2021001143	A1	2021年10月22日
CN	104640881	A	2015年5月20日	TW	201945398	A	2019年12月1日
				TWI	697502	B	2020年7月1日
				PH	12019502070	A1	2021年1月18日
				US	2022144947	A1	2022年5月12日
				AU	2020239677	A1	2020年10月15日
				NZ	706232	A	2018年11月30日
				TW	201418282	A	2014年5月16日
				TWI	618716	B	2018年3月21日
				NZ	742078	A	2020年1月31日
				JOP	20200237	A1	2017年6月16日
				AU	2013318059	A1	2015年4月9日
				AU	2013318059	B2	2018年10月18日
				AU	2013318059	C1	2020年10月15日
				CL	2017001729	A1	2018年3月16日
				MY	179577	A	2020年11月11日
				JO	3716	B1	2021年1月31日
				SG	10201704833	WA	2017年7月28日
				KR	20150046789	A	2015年4月30日
				KR	102163136	B1	2020年10月12日
				US	2014088295	A1	2014年3月27日
				US	9657102	B2	2017年5月23日
				US	2017320948	A1	2017年11月9日
				US	11072656	B2	2021年7月27日
				BR	112015005380	A2	2017年8月8日
				BR	112015005380	B1	2022年11月29日
				IL	237301	A0	2015年4月30日
				IL	237301	B	2020年8月31日
				AR	092612	A1	2015年4月29日
				CL	2020003179	A1	2021年4月30日
				PH	12015500328	A1	2015年3月30日
				EA	201590613	A1	2015年8月31日
				EA	033400	B1	2019年10月31日
				JP	2021130701	A	2021年9月9日
				SG	10202111095	XA	2021年11月29日
				HK	1212996	A1	2016年6月24日
				AU	2018232926	A1	2018年10月4日
				AU	2018232926	B2	2020年6月25日
				EP	3778641	A1	2021年2月17日
				CL	2015000713	A1	2015年7月10日
				JP	2021020961	A	2021年2月18日
				JP	6865324	B2	2021年4月28日
				KR	20200116548	A	2020年10月12日
				KR	102470709	B1	2022年11月28日
				SG	11201501269	XA	2015年3月30日
				JP	2015535828	A	2015年12月17日
				JP	6923292	B2	2021年8月18日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/072510

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				WO	2014047231	A1	2014年3月27日
				TW	201809007	A	2018年3月16日
				TWI	688573	B	2020年3月21日
				CA	3135724	A1	2014年3月27日
				US	2018215823	A1	2018年8月2日
				US	11155621	B2	2021年10月26日
				JOP	20200236	A1	2017年6月16日
				JP	2019214591	A	2019年12月19日
				MX	2015003206	A	2015年7月14日
				CO	7400860	A2	2015年9月30日
				EP	2897981	A1	2015年7月29日
				TW	202039579	A	2020年11月1日
				MX	2020004119	A	2020年8月10日
				CA	2885156	A1	2014年3月27日
				CA	2885156	C	2021年12月7日
				IL	268369	A	2019年9月26日
				IL	268369	B	2021年2月28日
				UY	35042	A	2014年4月30日
CN	108059680	A	2018年5月22日		无		
CN	110041429	A	2019年7月23日		无		
CN	112955471	A	2021年6月11日	ZA	202104518	B	2023年1月25日
				EP	3892639	A1	2021年10月13日
				EP	3892639	A4	2022年8月24日
				JP	2022510322	A	2022年1月26日
				CA	3121565	A1	2020年6月11日
				BR	112021010026	A2	2021年8月17日
				US	2022242953	A1	2022年8月4日
				AU	2019394241	A1	2021年6月3日
				TW	202021987	A	2020年6月16日
				KR	20210100654	A	2021年8月17日
				WO	2020114478	A1	2020年6月11日
CN	112996807	A	2021年6月18日		无		
TW	202030206	A	2020年8月16日	KR	20210120031	A	2021年10月6日
				EP	3917969	A1	2021年12月8日
				EP	3917969	A4	2023年2月1日
				WO	2020156405	A1	2020年8月6日
				TWI	754211	B	2022年2月1日
				JP	2022518530	A	2022年3月15日
				US	2022162312	A1	2022年5月26日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N	*5/10 (2006.01)*	C12N	5/10		4C087
C12P	*21/08 (2006.01)*	C12P	21/08		4H045
A61P	*35/00 (2006.01)*	A61P	35/00		
A61P	*35/02 (2006.01)*	A61P	35/02		
A61K	*39/395(2006.01)*	A61K	39/395	E	
A61K	*31/7088(2006.01)*	A61K	39/395	T	
A61K	*48/00 (2006.01)*	A61K	31/7088		
A61K	*35/12 (2015.01)*	A61K	48/00		
G01N	*33/53 (2006.01)*	A61K	35/12		
G01N	*33/531(2006.01)*	G01N	33/53	D	
		G01N	33/531	A	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

(74)代理人 100120617
弁理士 浅野 真理
(74)代理人 100126099
弁理士 反町 洋
(72)発明者 フォン、ホイ
中華人民共和国チアンスー、スーチョウ、ウーチアン、エコノミック、アンド、テクノロジカル、ディベロップメント、ゾーン、イースト、オブ、チャンアン、ロード
(72)発明者 チョウ、ユエホア
中華人民共和国チアンスー、スーチョウ、ウーチアン、エコノミック、アンド、テクノロジカル、ディベロップメント、ゾーン、イースト、オブ、チャンアン、ロード
(72)発明者 リウ、タンタン
中華人民共和国チアンスー、スーチョウ、ウーチアン、エコノミック、アンド、テクノロジカル、ディベロップメント、ゾーン、イースト、オブ、チャンアン、ロード
(72)発明者 リウ、ホンチョアン
中華人民共和国チアンスー、スーチョウ、ウーチアン、エコノミック、アンド、テクノロジカル、ディベロップメント、ゾーン、イースト、オブ、チャンアン、ロード
(72)発明者 リー、ルイション
中華人民共和国チアンスー、スーチョウ、ウーチアン、エコノミック、アンド、テクノロジカル、ディベロップメント、ゾーン、イースト、オブ、チャンアン、ロード
(72)発明者 リウ、ホイ
中華人民共和国チアンスー、スーチョウ、ウーチアン、エコノミック、アンド、テクノロジカル、ディベロップメント、ゾーン、イースト、オブ、チャンアン、ロード
(72)発明者 ホー、チーチュアン
中華人民共和国チアンスー、スーチョウ、ウーチアン、エコノミック、アンド、テクノロジカル、ディベロップメント、ゾーン、イースト、オブ、チャンアン、ロード

Ｆターム（参考） 4B064 AG27 CA19 CC24 CE12 DA01 DA13
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
4C084 AA13 NA14 ZB26 ZB27
4C085 AA13 AA14 BB36 CC22 DD62 EE01

Fターム（参考） 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZB27
4C087 AA01 AA02 BB33 BB65 BC83 NA14 ZB26 ZB27
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74 GA26